

LUIZ EDUARDO TEDESCO MARCHIORO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E DERIVADOS POR BACTÉRIAS  
FIXADORAS DE NITROGÊNIO**

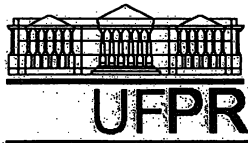
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães  
Cruz

CURITIBA

2005




### **ATA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aos vinte e sete dias do mês de maio de dois mil e cinco, às quatorze horas, no Anfiteatro 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria do Pós-Graduando em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Luiz Eduardo Tedesco Marchioro, intitulada **"Produção de aia e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio"**, sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki e a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro (Departamento de Bioquímica/UFPR), Dr. Metry Bacila (Departamento de Bioquímica/PUCPR) e Dr<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente (Departamento de Patologia Básica/UFPR), suplente. A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve 60 (sessenta) minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida durante 30 (trinta) minutos por cada um dos membros da Banca Examinadora, e tendo 30 (trinta) minutos para responder a cada uma das arguições. No final o candidato foi aprovado, segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação. Para a devida publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 27 de maio de 2005.

  
Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki - presidente

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro

  
Prof. Dr. Metry Bacila

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente - suplente

**LUIZ EDUARDO TEDESCO MARCHIORO**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E DERIVADOS POR BACTÉRIAS  
FIXADORAS DE NITROGÊNIO**

**CURITIBA**

**2005**

Orientadores: Dr. Guilherme Lanzi Sassaki  
Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Dedico este trabalho a todos os  
meus entes queridos.  
Meus pais, minha irmã e meus  
amigos.

Aos estimados Doutores  
Guilherme L. Sasaki, Leonardo  
M. Cruz, meus orientadores na  
Pós-graduação, de quem colhi os  
princípios fundamentais ao  
“homem-pesquisador”: a ética, a  
dignidade e o humanismo.

“Pondo de lado todo o  
impedimento ...corramos com  
perseverança a carreira que nos  
está proposta.” - *Paulo*, (Hebreus,  
12:1.)

## **Agradecimentos**

Um agradecimento especial aos Professores Guilherme L. Sassaki e Leonardo Magalhães Cruz pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade e incentivo.

Aos meus amigos e padrinhos científicos Dr. Metry Bacila e Dr<sup>a</sup>. Maria Ivette C. Malucelli pela dedicação, incentivo, humildade e por terem me introduzido no maravilhoso mundo da Pesquisa, no qual espero que possamos partilhar conquistas.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia pela oportunidade e desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo apoio, amizade e agradável convívio.

Aos meus Pais Renato e Pérola e minha irmã Ana Paula por terem assegurado meu equilíbrio emocional durante todo o Curso.

Sou eternamente grato.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
ABSTRACT.....	xi
RESUMO.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	1
1.1.1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE.....	2
1.1.2. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS.....	7
1.2. FITOHORMÔNIOS.....	9
1.2.1. AUXINAS.....	11
1.2.2. VIA METABÓLICA DE PRODUÇÃO DE AIA.....	14
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. LINHAGENS UTILIZADAS.....	18
3.2. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	21
3.3. PREPARO DAS LINHAGENS PARA AVALIAÇÃO PELO REAGENTE DE SALKOWSKI.....	23
3.4. TESTE PARA PRODUÇÃO DE AIA E DERIVADOS PELO REAGENTE DE SALKOWSKI.....	24
3.5. SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AIA E DERIVADOS ATRAVÉS DO REAGENTE DE SALKOWSKI.....	24
3.6. QUANTIFICAÇÃO DO AIA E DERIVADOS PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	24
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA ATRAVÉS DO MÉTODO DE BRADFORD.....	25
3.8. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS POR MÉTODO ESPECTROFOTÔMETRO.....	25
3.9. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SOBRENADANTE E CÉLULAS.....	26
3.10. CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).....	26
3.11. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD OU TLC).....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
4.1. TESTE DE SENSIBILIDADE DO REAGENTE DE SALKOWSKI NA IDENTIFICAÇÃO DO AIA E DERIVADOS.....	28
4.2. PRODUÇÃO DE AIA E DERIVADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIATIVAS.....	35
4.3. ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE AIA E DERIVADOS EM RELAÇÃO À PROTEÍNA NA LINHAGEM Z78.....	44
4.4. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA.....	47
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS AUXINAS NATURAIS E SINTÉTICAS.....	13
FIGURA 2. BIOSÍNTESE DO 3 ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) A PARTIR DO AMINOÁCIDO TRIPTOFANO.....	16
TABELA 1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS UTILIZADAS NO TESTE DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO AIA.....	18
TABELA 2. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS REFERÊNCIA UTILIZADAS NO TESTE DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO AIA.....	20
FIGURA 3. TESTE DE SALKOWSKI EM AMOSTRAS DE <i>Herbaspirillum</i> spp UTILIZANDO O REAGENTE S2 1:1V/V.....	29
FIGURA 4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE.....	32
FIGURA 5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Azospirillum</i> USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE.....	33
FIGURA 6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Rhizobium</i> USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE.....	34
TABELA 3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS POR TRINTA E CINCO LINHAGENS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, USANDO MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM TRIPTOFANO.....	38
FIGURA 7. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>Herbaspirillum</i> .....	41
FIGURA 8. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>Azospirillum</i> .....	42
FIGURA 9. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>Rhizobium</i> .....	43
FIGURA 10. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DA LINHAGEM Z78 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	46
FIGURA 11. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DO EXTRATO TOTAL DA LINHAGEM M2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	48

FIGURA12. PRODUÇÃO DE AIA E CRESCIMENTO DA LINHAGEM Z78 ( <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ) EM DEEP-WELL-BLOCK.....	62
--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

FBN	- Fixação Biológica de Nitrogênio
AlA / IAA	- ácido indol acético/ indole acetic acid
CNPAB	- Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia
ANA	- ácido naftalenoacético
AlB	- ácido indol-3-butírico
2,4DP	- 2-4-diclorofenoxipropiônico
4-CPA	- ácido-p-clorofenoxiacético
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- ácido sulfúrico
FeCl <sub>3</sub>	- cloreto férrico
S1	- reagente de Salkowski 10,8 mol/L
S2	- reagente de Salkowski 7,9 mol/L
Trp	- triptofano
CH <sub>3</sub> OH	- metanol
CHCl <sub>3</sub>	- clorofórmio
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	- propanol
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	- acetona
NFB-mal	- meio de cultura suplementado com malato
NFB-lac	- meio de cultura suplementado com lactato
TY	- triptona e extrato de levedura
JMV	- meio de cultura JMV
r.p.m.	- rotações por minuto
v/v	- volume por volume
λ	- comprimento de onda
nm	- nanômetro
M	- mol/L
RFLP	- Restriction Fragment Length Polymorphism

## ABSTRACT

Phytohormones are substances that influence the physiological processes in low concentrations controlling the growth of the plant. Some strain known as diazotrophs can colonize the plant without causing apparent damage to their hosts, and possibly benefit them of diverse forms. Many endophytic diazotrophs can produce phytohormones and, therefore, are capable of promoting plant growth. The objective of this experiment was to search the production of promoter of the plant growth, indole acetic acid (IAA) and derivatives in isolated endophytic diazotrophs of grass, pineapple, banana and palm between these, bacteria belonging to the *Azospirillum* spp, *Herbaspirillum* spp, *Ochrobactrum* spp, *Burkholderia* spp genera, and also strains of the symbiotic diazotrophs *Rhizobium* spp. We have used the Salkowski assay to detect IAA and derivatives in culture supernatants of strains. First we evaluate two variants of Salkowski reagent, named S1 (10.8M of  $H_2SO_4$  with 4.5g  $FeCl_3$ ) and S2 (7.9M of  $H_2SO_4$  with 1.2g  $FeCl_3$ ) and two ratios of sample and the Salkowski reagent (1:1 and 1:4) for both, S1 and S2. Variation in the test was detected in relation to the used reagents (S1 or S2) and sample/reagent ratio. The results showed no detection for 1:4 ratio, independent of the reagent used. On the other hand, the results obtained with the 1:1 ratio revealed more satisfactory and allowed quantification of IAA. The IAA concentrations of culture supernatants of 15 strains were determined during growth in a period of 96 h. The highest IAA production occurred between 24-48 h. However, a great variations in IAA production was observed. Among the tested strains X8 (*H. seropedicae*), A3b (*Azospirillum* spp), BR322 (*Rhizobium* spp) and FP2 (*A. brasilense*), showed the highest levels of IAA: 31.52 $\mu$ g/mL, 75.27 $\mu$ g/mL, 24.80 $\mu$ g/mL and 31.45 $\mu$ g/mL, respectively. 77% tested endophytic diazotroph strains produced significant amounts of IAA and derivatives that could effectively be quantified by the S2 reagent.

## RESUMO

Fitohormônios são substâncias que influenciam os processos fisiológicos em baixas concentrações controlando o crescimento da planta. Algumas linhagens conhecidas como diazotrofos podem colonizar o interior da planta sem causar danos aparentes a seus hospedeiros, e possibilitam benefícios de diversas formas. Muitos diazotrofos endofíticos podem produzir fitohormônios, e são conseqüentemente capazes de promover o crescimento de planta. O objetivo deste experimento foi pesquisar a produção do promotor do crescimento de planta, ácido indol acético (AIA) e derivados em diazotrofos endofíticos isolados de gramínea, abacaxi, banana e palmeira entre estes, as bactérias que pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum* e também estirpes de *Rhizobium*. Foi usado o ensaio de Salkowski para detectar AIA e derivados em sobrenadantes da cultura da coleção das estirpes. Primeiramente avaliou-se duas variações do reagente de Salkowski, nomeados S1 (10.8M do  $H_2SO_4$  com 4.5g  $FeCl_3$ ) e S2 (7.9M do  $H_2SO_4$  com 1.2g  $FeCl_3$ ) e duas reações da amostra e o reagente de Salkowski (1:1 e 1:4 v/v) para ambos, S1 e variação de S2. Variações no teste foram detectadas em relação ao reagente usado (S1 ou S2) e a reação amostra/reagente. Os resultados não mostraram nenhuma detecção para a reação de 1:4, independente do reagente usado. Em outro momento, os resultados obtidos com a relação de 1:1 revelaram mais sensibilidade e permitiu quantificar o AIA. As concentrações de AIA dos sobrenadantes da cultura de 48 linhagens foram determinadas durante o crescimento em um período de 96 h. e a produção a mais elevada de AIA ocorreu entre 24-48 h. Entretanto, variações grandes na produção de AIA, foram observadas. Entre as bactérias testadas X8 (*H. seropedicae*), A3b (*Azospirillum* spp), BR322 (*Rhizobium* spp) and FP2 (*A. brasilense*), mostraram os níveis os mais elevados de AIA: 31.52 $\mu$ g/mL, 75.27 $\mu$ g/mL, 24.80 $\mu$ g/mL and 31.45 $\mu$ g/mL, respectivamente. 77% das linhagens de diazotrofos endofíticos testados produziram quantidades significantes de AIA e derivados que poderiam efetivamente serem quantificados pelo reagente S2.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Descoberto há mais de 100 anos, o processo de fixação de nitrogênio por bactérias funciona da seguinte maneira: a bactéria inoculada na raiz da planta cria nódulos, onde a bactéria vai buscar alimento; usando o nitrogênio do ar, a bactéria produz enzimas e proteínas, que servirão como nutriente das plantas e da própria bactéria. Pesquisadores também relataram que alguns microrganismos do solo eram responsáveis pela captação do nitrogênio do ar (KENNEDY & ISLAM 2001, FREIRE 1992).

Somente formas mais reduzidas deste elemento podem ser assimiladas pelos organismos vivos. Os microrganismos do solo, possuem como principal fonte de nitrogênio materiais vegetais (como restos de cultura, adubo verde ou serapilheira) ou de natureza animal, fertilizantes industriais, sais de amônio e nitratos trazidos pela precipitação, e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por microrganismos conhecidos como diazotróficos. (CARDOSO, 1992).

A (FBN) é a maior responsável pelo aporte de nitrogênio nos sistemas biológicos, contribuindo com cerca de 65% do nitrogênio fixado (NEWTON, 1999). Este processo consiste na transformação do nitrogênio molecular ( $N_2$ ) em formas mais reduzidas, como  $NH_3$ , que podem ser assimiladas pelos organismos vivos.

Diversas bactérias, como *Rhodospirillum* spp e algumas bactérias fotossintéticas, são fixadoras de nitrogênio (KAMEN & GEST, 1949; KAMEN, 1953), assim como uma grande variedade de bactérias do solo, semelhantes a *Pseudomonas* spp. (ANDERSON, 1955).

Grande parte dos microrganismos diazotróficos, evoluíram no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono, que são exsudados pelas raízes (SPRENT & FARIA, 1989).

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos. Muitas dessas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas que garantem proteção contra fatores adversos do solo (SPRENT & FARIA, 1989).

A exploração agrícola da FBN nos países desenvolvidos tem sido motivada pela

conscientização ecológica sobre o uso intensivo e, às vezes, abusivo dos agroquímicos além de representar uma diminuição no custo da produção. Esta ainda não é a grande preocupação em muitos países em desenvolvimento. De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento das bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera.

Pesquisadores da Índia (RAO, 1983; GHAI & THOMAS, 1989) isolaram bactérias do gênero *Azospirillum* da rizosfera. Pesquisadores brasileiros (WEBER, 1998; WEBER *et al.*, 1999; WEBER *et al.*, 2001), do grupo de J. Döbereiner, identificaram várias bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. O número de espécies diazotróficas vem aumentando devido a importância destas nos sistemas agrícolas. Estas podem ser, de forma geral, agrupadas em bactérias diazotróficas de vida livre e bactérias diazotróficas simbióticas.

### 1.1.1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE

Várias espécies diazotróficas vivem livres no solo. Nos sistemas agrícolas, as bactérias de vida livre são limitadas pela disponibilidade de fontes de carbono no solo. O potencial de algumas bactérias aeróbicas ou microaerófilas de vida livre, como o *Azotobacter* spp e *Azospirillum* spp, é demonstrado por meio da inoculação de palhada ou outros resíduos ricos em carbono e sua incorporação ao solo (HILL & PATRIQUIN, 1996), resultando em altas taxas de FBN. Em solos sujeitos a inundação, outras classes de microrganismos diazotróficos, inclusive anaeróbios, contribui para o balanço de nitrogênio do sistema (ROPER & LADHA, 1995).

Organismos do gênero *Pseudomonas* formam um grupo heterogêneo (com muitas das espécies já reclassificadas), caracterizado por sua versatilidade catabólica, que possibilita a utilização de uma faixa muito ampla de substratos como fonte de carbono. Algumas espécies dentro desse gênero são diazotróficas e estima-se que sejam bem menos limitadas, quanto à fonte de energia, do que outros microrganismos diazotróficos de vida livre. Na rizosfera de algumas espécies vegetais, as espécies diazotróficas desse gênero costumam ser dominantes (CHEN *et al.*, 1994).

O *Paspalum notatum* é uma gramínea forrageira comum nas regiões tropicais, a qual se associa especificamente à espécie diazotrófica *Azotobacter paspali* (DÖBEREINER,



1966). A bactéria parece se estabelecer na rizosfera (região do solo sob influência das raízes) ou mesmo invadir as camadas externas do córtex de um dos ecotipos dessa gramínea, o ecotipo tetraplóide. *Paspalum notatum* *batatais*, na qual foi encontrada em 93% das cerca de duzentas e cinquenta amostras testadas. Muito raramente é encontrada associada a outros ecotipos ou espécies de *Paspalum* spp, não ocorrendo em outros gêneros de gramíneas (DÖBEREINER, 1970).

A capacidade dessa associação em contribuir com a fixação de nitrogênio para o crescimento das plantas foi demonstrada (DE-POLLI *et al.*, 1977) e estimada por BODDEY *et al.* (1983).

As espécies de *Beijerinckia* spp (*Beijerinckia derxii*, *Beijerinckia mobilis*, *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia fluminensis*), bastante tolerantes à acidez, são bactérias comuns nos solos das regiões tropicais, mas, também, são encontradas em regiões temperadas (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). A espécie *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia fluminensis* têm sido freqüentemente encontradas em solos de canaviais e principalmente na rizosfera e rizoplane da cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1959). Parece ocorrer um enriquecimento seletivo em favor dessas bactérias nas regiões do solo próximas das plantas, onde exsudatos radiculares são liberados, e também na área entre linhas de plantio, onde os exsudatos foliares, lavados pelas chuvas, são depositados (DÖBEREINER & ALVAHYDO, 1959).

Pelo menos três espécies de *Bacillus* spp são descritos como diazotróficos: *Bacillus polymixa*, *Bacillus macerans* e *Bacillus azotofixans*. Esta última espécie é freqüentemente isolada de solo e raízes de cana-de-açúcar, trigo e outras gramíneas (SELDIN *et al.*, 1984) e foi recentemente transferida para o gênero *Paenibacillus* (ROSATO *et al.*, 1995). A característica interessante desta espécie está relacionada com sua capacidade de FBN, mesmo em presença de níveis altos de nitrato e com a produção de substâncias antimicrobianas.

A espécie *Spirillum lipoferum* foi redescoberta no Brasil como bactéria diazotrófica associada à rizosfera e raízes de várias gramíneas (DÖBEREINER & DAY, 1976) e, logo depois, reclassificada como de um novo gênero *Azospirillum* spp (TARRAND *et al.*, 1978). Sete espécies estão atualmente descritas: *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferans*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum doebereineriae* (DÖBEREINER *et al.*, 1995b), e todas elas de ocorrência em regiões tropicais. Nestas duas décadas de pesquisa, um volume

considerável de informações foi acumulado sobre as associações dessas bactérias com diversas espécies de gramíneas (BALDANI *et al.*, 1996a).

O *Azospirillum* spp apresenta ampla distribuição nos solos (DÖBEREINER & DE-POLLI, 1980). Pouco se sabe, porém, sobre a sobrevivência do *Azospirillum* spp no solo na ausência da planta hospedeira, mas tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos, produção de melanina, de poli- $\beta$ -hidroxibutirato), que podem facilitar a sobrevivência em condições desfavoráveis (DEL GALLO & FENDIRIK, 1994). O *Azospirillum* spp é, entretanto, uma bactéria predominantemente rizosférica (MAGALHÃES *et al.*, 1979; FREITAS *et al.*, 1981).

O padrão de colonização das raízes das gramíneas pelas espécies de *Azospirillum* spp mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as bactérias: *Azospirillum lipoferum* ocorre preferencialmente no córtex de milho, sorgo e de diversas outras gramíneas, mas foi também observada em uma espécie de ciperácea (DÖBEREINER, 1982), enquanto *Azospirillum brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e gramíneas (DÖBEREINER & DE-POLLI, 1980; ROCHA *et al.*, 1981). *Azospirillum halopraeferans* é mais específica, tendo sido isolada apenas de uma espécie de gramínea, o 'Kallar grass' (*Leptochloa fusca*), planta nativa do Paquistão, altamente tolerante a solos salinos (REINHOLD *et al.*, 1987). Já a espécie *Azospirillum irakense*, tem sido apenas isolada de raízes de arroz (KHAMMAS *et al.*, 1989).

Os efeitos da colonização do *Azospirillum* spp sobre a morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associam são marcantes (OKON & KAPULNIK, 1986). Têm sido observadas alterações na densidade e no comprimento dos pêlos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo (OKON *et al.*, 1996). Tais efeitos são associados à capacidade deste e outros microrganismos diazotróficos rizosféricos liberarem substâncias promotoras do crescimento: AIA, giberelinas e citocininas (TIEN *et al.*, 1979).

Certas linhagens de *Azospirillum* spp podem invadir as raízes, através da lamela média dos tecidos mais velhos, formando áreas transparentes, que sugerem por hidrólise das células do vegetal por enzimas pectinolíticas, produzidas por essas bactérias (HUBBELL *et al.*, 1978). Em plantas de milho crescidas no campo a infecção dos tecidos das raízes e colmos pela bactéria ocorre apenas no período reprodutivo das plantas (MAGALHÃES *et al.*, 1979), período em que também se observam as maiores taxas de atividade da nitrogenase (enzima

responsável pela redução de  $N_2$  a  $NH_3$ ). Observações semelhantes já foram relatadas para arroz (WATANABE & BARRAQUIO, 1979) e trigo (KAVIMANDAN *et al.*, 1978).

A infecção do interior das raízes de gramíneas não é característica generalizada das estirpes de *Azospirillum brasilense* e parece restrita à linhagem Sp245 (BALDANI *et al.*, 1987; HARTMANN *et al.*, 1995). Dentro da planta, as bactérias ficam livres da competição com os demais habitantes da rizosfera e as trocas de nutrientes entre estas e a planta hospedeira se tornam muito mais efetivas.

Apesar das propriedades fisiológicas do *Azospirillum* spp em meio de cultura já terem sido objeto de muitos estudos, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na interação planta/bactéria, devido, principalmente, a ausência de um fenótipo facilmente detectável após a inoculação das plantas (DEL GALLO & FENDRIK, 1994).

Dados acumulados em mais de 20 anos de pesquisa demonstram que, em 60-70% dos experimentos feitos, há um efeito benéfico da inoculação de *Azospirillum* spp sobre o crescimento ou produção de algumas culturas de cereais e até de leguminosas (OKON *et al.*, 1996). Em alguns desses experimentos, a inoculação com *Azospirillum* spp proporcionou incorporação de nitrogênio via FBN (GARCIA DE SALAMONE, 1993). Em Israel, onde o *Azospirillum* spp não ocorre abundantemente nos solos, tem sido possível observar efeitos benéficos da inoculação de *Azospirillum* spp sobre a produção de cereais, principalmente através da produção de substâncias promotoras de crescimento (OKON, 1985). No Brasil, este microrganismo ocorre em profusão nos solos agrícolas, limitando a introdução de linhagens selecionadas. Porém, o uso de estirpes selecionadas e marcadas com resistência a antimicrobianos, foi possível observar o efeito da inoculação do *Azospirillum brasilense* em plantas de sorgo, trigo (BALDANI *et al.*, 1986a) e milho, sendo o efeito benéfico da inoculação de algumas linhagens (Sp245) relacionado principalmente com o melhor aproveitamento dos nitratos do solo (BODDEY *et al.*, 1986; FERREIRA *et al.*, 1987).

Muitas espécies de bactérias diazotróficas evoluíram no sentido de formar associações mais ou menos íntimas com as plantas, geralmente com as raízes e colmos de plantas superiores. Neste caso, a planta supre os compostos de carbono necessários para a FBN. Diversas espécies de microrganismos diazotróficos associadas com vegetais têm sido identificadas atualmente, inclusive espécies endofíticas, indicando que o número desses microrganismos pode ser bem maior do que foi estimado a princípio.

A importância econômica das gramíneas tem motivado os estudos na área e o Brasil é

pioneiro no estudo dessas associações (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). O potencial da FBN em contribuir com nitrogênio para o crescimento de algumas espécies de gramíneas já foi demonstrado para algumas forrageiras, como o *Paspalum notatum* batatais, *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola* (DE-POLLI *et al.*, 1977; BODDEY & VICTORIA, 1986; MIRANDA *et al.*, 1990) e também para o arroz irrigado (APP *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995). É muito provável, porém, que a FBN detectada nessas plantas seja o resultado da atividade não de uma, mas de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados a elas.

O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono e livre de diversos fatores adversos que limitam as populações de bactérias no solo e rizosfera. A colonização endofítica de plantas sempre foi, entretanto, considerada restrita a bactérias fitopatogênicas. Bactérias diazotróficas endofíticas, predominantemente, trouxe uma nova dimensão aos estudos das associações de microrganismos diazotróficos e plantas superiores. Os diazotróficos endofíticos não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, estão livres de competição com outros microrganismos e podem transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta (NEVES, 1985).

*Herbaspirillum seropedicae* pode ser isolado de arroz, milho e sorgo (BALDANI *et al.*, 1986a), de raízes, folhas e colmos de *Pennisetum purpureum*, cana-de-açúcar e diversas gramíneas invasoras (OLIVARES *et al.*, 1996). A bactéria sobrevive muito mal no solo, desaparecendo em menos de trinta dias após sua inoculação com grande número de células (BALDANI *et al.*, 1996a). *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (previamente *Pseudomonas rubrisubalbicans*, BALDANI *et al.*, 1996a) vive associado à cana-de-açúcar, podendo esta causar uma doença conhecida como "estria mosqueada" em algumas cultivares.

Através da microscopia eletrônica é possível observar a intensa colonização dos tecidos vasculares da cana-de-açúcar pelas duas espécies de *Herbaspirillum* spp.

As bactérias têm sido também observadas nos estômatos da cana-de-açúcar. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em alguns casos parece preencher todos os vasos do protoxilema e metaxilema, além dos espaços intercelulares do mesófilo (DÖBEREINER *et al.*, 1995a), causando sintomas da doença, estria mosqueada vermelha.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica, adaptada às condições de pressão osmótica e pH, que prevalecem no interior da cana-de-açúcar (GILLIS *et al.*, 1989). Vem sendo isolada de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, *Pennisetum*

*purpureum* e batata-doce (DÖBEREINER, 1992). As plantas com as quais se associa têm em comum um alto teor de carboidratos nos tecidos e o hábito vegetativo de propagação. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é isolado de cana-de-açúcar em diversos países (Uruguai, México, Austrália, Cuba, África do Sul), onde a planta é cultivada.

Dentre as propriedades fisiológicas características dessa espécie de bactéria destaca-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por COJHO *et al.* (1993). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pela linhagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (JAMES *et al.*, 1994; OLIVARES *et al.*, 1996). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (JAMES *et al.*, 1994). Dentro da raiz, pode ser vista, no interior, de células da epiderme e nos espaços intercelulares do parênquima, bem como dentro de vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (DONG *et al.*, 1994; REIS JR. *et al.*, 1995).

O potencial das associações de microrganismos diazotróficos com a cana-de-açúcar foi avaliado (BODDEY *et al.*, 1995) e estimado como capaz de suprir até 60% das necessidades de N fixado desta cultura, garantindo um bom crescimento das plantas, mesmo em solos pobres. Restando determinar qual, ou quais, dos diferentes microrganismos diazotróficos rizosféricos e endofíticos podem ocorrer na cana-de-açúcar são os responsáveis pelas altas taxas de FBN observadas em alguns cultivos.

Um novo gênero de microrganismo diazotrófico endofítico está sendo objeto de estudos recentes: *Burkholderia* spp, recentemente criado a partir de linhagens antes incluídas no gênero *Pseudomonas* spp. (YABBUCHI, KOSAKO *et al.*, 1992). Estirpes pertencentes a diferentes espécies dentro desse gênero foram isoladas de arroz no Vietnã (TRAN VAN, GILLIS *et al.*, 1994) e de cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e arroz, no Brasil (BALDANI *et al.*, 1996a). A lista de microrganismos diazotróficos endofíticos compreende também as espécies de *Azoarcus* spp. (REINHOLD, HUREK *et al.*, 1993), de ocorrência restrita à espécie de gramínea *Leptochloa fusca* (Kallar grass).

### 1.1.2. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS

As bactérias dos gêneros *Rhizobium* spp, *Bradyrhizobium* spp, *Mesorhizobium* spp, *Sinorhizobium* spp e *Azorhizobium* spp (YOUNG, 1996), são microrganismos rizosféricos,

que estabelecem associações simbióticas com as leguminosas principalmente espécies das subfamílias Papilionoideae, Mimosoideae e com *Parasponia* spp, uma Ulmaceae (TRINICK & HADOBAS, 1988), formando estruturas especiais nas raízes ou caule, denominadas nódulos.

Numerosos estudos, objetivando levantamento, isolamento e seleção de rizóbio com características de tolerância ao estresse (acidez do solo, acompanhada do aumento do teor de alumínio), têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais. Desde 1984, foram descritos treze espécies e dois gêneros (*Azorhizobium* spp, um rizóbio que forma nódulos caulinares e *Sinorhizobium* spp). O isolamento e a seleção de numerosas linhagens capazes de nodular o feijoeiro revelaram diferenças genéticas marcantes entre os isolados, resultando na identificação de duas novas espécies dentro da antiga espécie *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991) e *Rhizobium etli* (SEGOVIA *et al.*, 1993). Novos estudos têm indicado uma diversidade ainda maior, pois cerca da metade dos isolados obtidos dos solos dos cerrados brasileiros não apresentam similaridade com nenhuma das três espécies capazes de nodular o feijoeiro (MERCANTE *et al.*, 1996).

O inventário das leguminosas arbóreas da região amazônica resultou em uma vasta coleção de rizóbios. Uma caracterização inicial dessa coleção demonstrou um alto grau de diferenciação (MOREIRA *et al.*, 1993). Alguns isolados de crescimento rápido mostraram grande semelhança com as espécies *Rhizobium loti*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium leguminosarum phaseoli* e *Sinorhizobium fredii*, porém a maioria dos grupos não se assemelhou a nenhuma das espécies já descritas. A lista de espécies de rizóbio cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a serem descritas, na medida em que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e de respectivos rizóbios.

A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de N<sub>2</sub> de maior importância para a agricultura e, em mais de um século de estudos, uma vasta gama de conhecimentos vem sendo acumulada sobre a ecologia da bactéria de vida livre, no solo e sobre a simbiose estabelecida com as leguminosas.

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios, caracterizada pela formação de nódulos radiculares ou caulinares tem sido objeto de estudos complexos, que resultaram na identificação de uma comunicação entre os dois parceiros, mediada pela troca de sinais moleculares específicos. Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio é quimiotaticamente

atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos, AIA exudado ou açúcares) exsudados pela planta (AGUILAR *et al.*, 1988; KAPE *et al.*, 1991). A partir daí, ocorre uma interação química específica entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) pelas raízes (HUNGRIA, 1994).

## 1.2.FITOHORMÔNIOS

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos em baixas concentrações.

Microrganismos endofíticos têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas). Alternativas envolvendo a aplicação de agentes microbianos para prevenção e controle de doenças e pragas na agricultura tem sido destacada (SOUZA, 2001). Em mudas micropropagadas de bananeira poderiam ser aplicadas bactérias diazotróficas no sentido de reduzir o uso de agrotóxicos e convergir para um sistema de produção integrada de frutas. A produção integrada, de acordo com SILVA *et al.* (2001), consiste em obter uma produção econômica de alta qualidade, com prioridade a métodos ecologicamente mais seguros, minimizando aplicações de agroquímicos e os seus efeitos secundários negativos, para promover a proteção do ambiente e a saúde humana.

Entretanto, o conhecimento do genótipo da planta e do microrganismo envolvido na promoção é de extrema importância. Neste aspecto, bactérias endofíticas dos gêneros *Gluconacetobacter* spp, *Acinetobacter* spp, *Actinomyces* spp, *Agrobacterium* spp, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Burkholderia* spp, *Curtobacterium* spp, *Pantoea* spp, *Pseudomonas* spp e *Xanthomonas* spp podem promover o crescimento vegetal. (PATTEN & GLICK, 1996)

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por microrganismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos. Além da interação entre o genótipo da planta e a comunidade endofítica promotora de crescimento, outros fatores interagem neste processo, como as comunidades microbianas epifíticas e da rizosfera. Neste aspecto, foi observado que a promoção de crescimento vegetal por endófitos

pode ser influenciada pela rotação da cultura, interação com patógenos, fixação de nitrogênio e síntese de fitohormônios.

Os fitohormônios podem ser classificados como: citocinina, giberelina, etileno e auxina.

Estudos fisiológicos sugerem muitas ligações entre os fitohormônios. Diversos outros hormônios modulam ou são modulados pelos níveis de auxina (DEMSON, 2005).

As citocininas assim chamadas porque estimulam a divisão celular (citocinese). As citocininas são produzidas nas raízes e transportadas através do xilema para todas as partes da planta. Embriões e frutos também produzem citocininas. (DEMSON, 2005).

As citocininas também atuam em associação com as auxinas no controle da dominância apical. As citocininas também retardam o envelhecimento das plantas. Uma das histórias mais-ditas na biologia da planta é o relacionamento entre a auxina e a citocinina, que pode ser empregado *in vitro* para induzir o desenvolvimento da raiz (SKOOG & MOLEIRO, 1957). Os níveis de auxina e de citocinina são correlacionados inversamente em vivo (EKLÖF *et al.*, 2000) e o tratamento com a auxina pode rapidamente inibir a biossíntese de citocinina (NORDSTRÖM *et al.*, 2004). Ramos e flores cortados e colocados em água envelhecem rapidamente pela falta de hormônio. A adição de citocinina na água dos vasos faz com que as flores cortadas durem bem mais tempo. É uma prática comum no comércio de plantas pulverizar citocinina sobre flores colhidas com a finalidade de retardar seu envelhecimento.

Em 1926 o cientista japonês E. Kurosawa descobriu uma doença em plantas de arroz causada por um fungo do gênero *Gibberella*. Quando plantas jovens eram atacadas por esse fungo, tornavam-se anormalmente altas devido a substância liberada pelo fungo, que foi denominada giberelina. Estudos posteriores mostraram que substâncias semelhantes às produzidas pelo fungo *Gibberella* spp estão presente normalmente nas plantas, onde controlam diversas funções (MALONEK *et al.*, 2005).

As giberelinas são hormônios produzidos principalmente nas raízes e nos brotos foliares, que atuam estimulando o crescimento de caules e folhas, mas têm pouco efeito sobre o crescimento das raízes. Juntamente com as auxinas, as giberelinas atuam no desenvolvimento dos frutos. As giberelinas desempenham junto com as citocininas, importante papel no processo de germinação das sementes. Como o etileno, a auxina inicia a produção do ácido giberélico GA (ROSS *et al.*, 2000), e a auxina transportada é necessária



para a produção das giberelinas na cevada (WOLBANG *et al.*, 2004). O gás etileno pode promover a degradação do gene repressor DELLA (SILVERSTONE *et al.*, 2001); o transporte da auxina impossibilita a degradação GA mediada pela proteína de DELLA (FU & HARBERD, 2003).

O etileno único fitohormônio na forma de gás, este é produzido em diversas partes da planta e difunde-se no ar existente entre as células. Os frutos em amadurecimento, outro efeito do etileno é, juntamente com a auxina participar da abscisão das folhas. Esse hormônio enfraquece as células a tal ponto que o peso da folha é suficiente para romper sua ligação com o caule. A folha então se destaca e cai. A auxina e o etileno gasoso são ligados também intimamente. A exposição exógena da auxina estimula a produção do etileno (MORGAN, 1962) com a indução de um gene que codifica uma enzima da biossíntese do etileno (ABEL *et al.*, 199). Inversamente, o etileno inibe (SUTTLE, 1988) o transporte lateral e longitudinal da auxina (BURG & BURG, 1966).

### 1.2.1.AUXINAS

O termo auxina foi criado pelos cientistas que examinavam substâncias de crescimento da planta na urina humana nomeado de auxinas A e B (KÖGL & HAAGEN SMIT, 1931). Um composto estrutural distinto com atividade de auxina isolado de fungos foi chamado heteroauxina; as auxinas A e B foram descartadas gradualmente para heteroauxina bioativa, que foi determinada mais tarde como 3-ácido indol acético (AIA) (THIMANN, 1977).

Auxina significa em grego "*crescer*" e o nome é dado a um grupo de compostos que estimulam o crescimento. O ácido indol acético (AIA) é a forma predominante. Evidência sugere que existem outras auxinas indólicas naturais nas plantas.

Além do AIA, outros compostos sintéticos também favorecem o crescimento das células: o ácido indenoacético, o ácido 2-benzofuranacético, o ácido 3-benzofuranacético, o ácido naftalenacético . Figura 1

Posteriormente, se observou que outros compostos que possuem anel indólico também promovem o crescimento, como o ácido 3-indolpirúvico, o ácido indolbutírico derivados do naftaleno como o ácido naftil-1-acético e o ácido naftoxi-2-acético. Por último, alguns ácidos fenoxiacéticos com atividade auxínica levou o descobrimento do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) com uma grande atividade. Sendo ponto de partida para descoberta de uma gama de

moléculas com atividade auxínica, como o ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (AMCP) e o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ambos com propriedades herbicidas quando empregados em concentrações elevadas e utilizados como armas químicas na guerra do Vietnã.

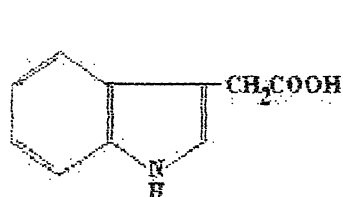
A principal auxina encontrada nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. Essa substância é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes. O transporte do AIA é unidirecional, dependendo de energia para ocorrer. Se um pedaço de caule é invertido, o AIA continua a se deslocar em direção à extremidade das raízes, contra a força de gravidade.

O principal efeito da auxina é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. As técnicas de cultivo de tecidos foram possíveis graças a ação das auxinas sobre a divisão celular. Assim, um pedaço de cenoura colocado em um meio de cultivo sem auxinas, sofre algumas divisões e morre, mas com a adição de AIA a uma concentração de  $10^{-6}$  mol/L as células se dividem de forma rápida e com um período de vida maior. Em outros casos, é necessária a presença de outros hormônios para garantir uma divisão celular contínua.

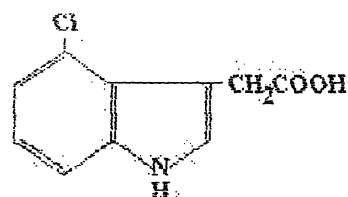
Em concentrações muito altas a auxina inibe a alongação celular e, portanto, o crescimento do órgão. A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz. (diferenciação celular, crescimento radicular, promovem crescimento dos frutos e controlam a abscisão).

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS AUXINAS NATURAIS E SINTÉTICAS.

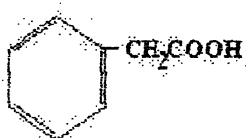
Auxinas naturais



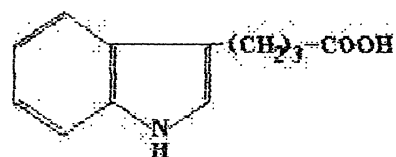
ácido 3-indolacético  
(AIA)



3 ácido 4-cloroindolacético

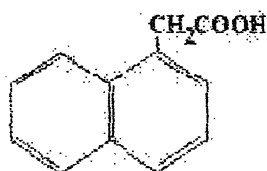


ácido fenilacético

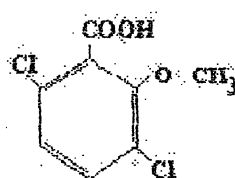


ácido 3-indolbutírico  
(AIB)

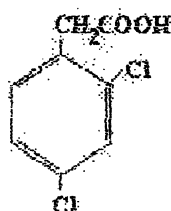
Auxinas sintética



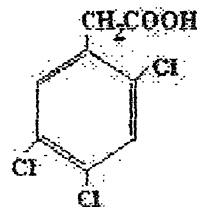
ácido naftalenoacético



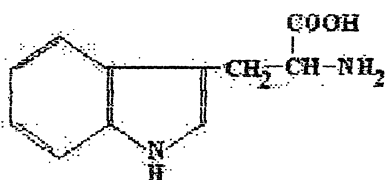
ácido 2-metoxi  
3,6-dicloro benzóico



2,4-diclorofenoxiacético  
(2,4-D)



ácido 2,4,5-triclorofenoxi acético  
(2,4,5-T)



triptofano = precursor do AIA

### 1.2.2.VIA METABÓLICA DA PRODUÇÃO DE AIA

Existem dados suficientes para demonstrar que o AIA é sintetizado a partir do triptofano. Esta transformação pode ser realizada por microrganismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres. As vias de sínteses do AIA se baseiam na evidência obtida a partir da presença de intermediários, atividade biológica e enzimas capazes de converter *in vivo* estes intermediários em AIA. Figura 2

No Brasil, estudos têm sido conduzidos com linhagens de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* capazes de produzir ácido indol acético (AIA) e compostos relacionados. Estas bactérias também são capazes de fixar N<sub>2</sub>, aumentando o seu potencial para a promoção de crescimento. Quatro isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* dos tecidos da raiz da cenoura, rabanete, beterraba e café, produziram AIA na presença do triptofano (MADHAIYAN, SARAVANAN, *et al* 2004). Outras bactérias como *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium* spp e *Pantoea agglomerans* vem sendo avaliadas quanto à promoção do crescimento de abacaxi, citros e eucaliptos, respectivamente.

A rizosfera é geralmente ocupada também por bactérias deletérias (RD) que inibem o crescimento das plantas e têm sido envolvidas em declínios na produção. Inúmeros relatos têm sido feitos sobre a presença de RD em várias culturas, gramíneas forrageiras e ervas-daninhas (NEHL *et al*, 1996), e muitas delas incluem *Enterobacter taylore*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp, *Bacillus polymixa*, *Bacillus cereus*. Entre os mecanismos que devem afetar o crescimento da planta pelas RDs é a produção de fitohormônios. Ácido indol acético (AIA) produzido por RD inibiu o crescimento radicular de beterraba (LOPER & SCHROTH, 1986), enquanto linhagens de *Pseudomonas* não produtoras de AIA não reduziram o crescimento radicular. SARWAR & KREMER (1995) verificaram que a inibição do crescimento radicular de algumas plantas cultivadas e ervas daninhas por uma linhagem de *Enterobacter taylore* que produz grandes quantidades de AIA foi aumentada por triptofano como precursor do AIA.

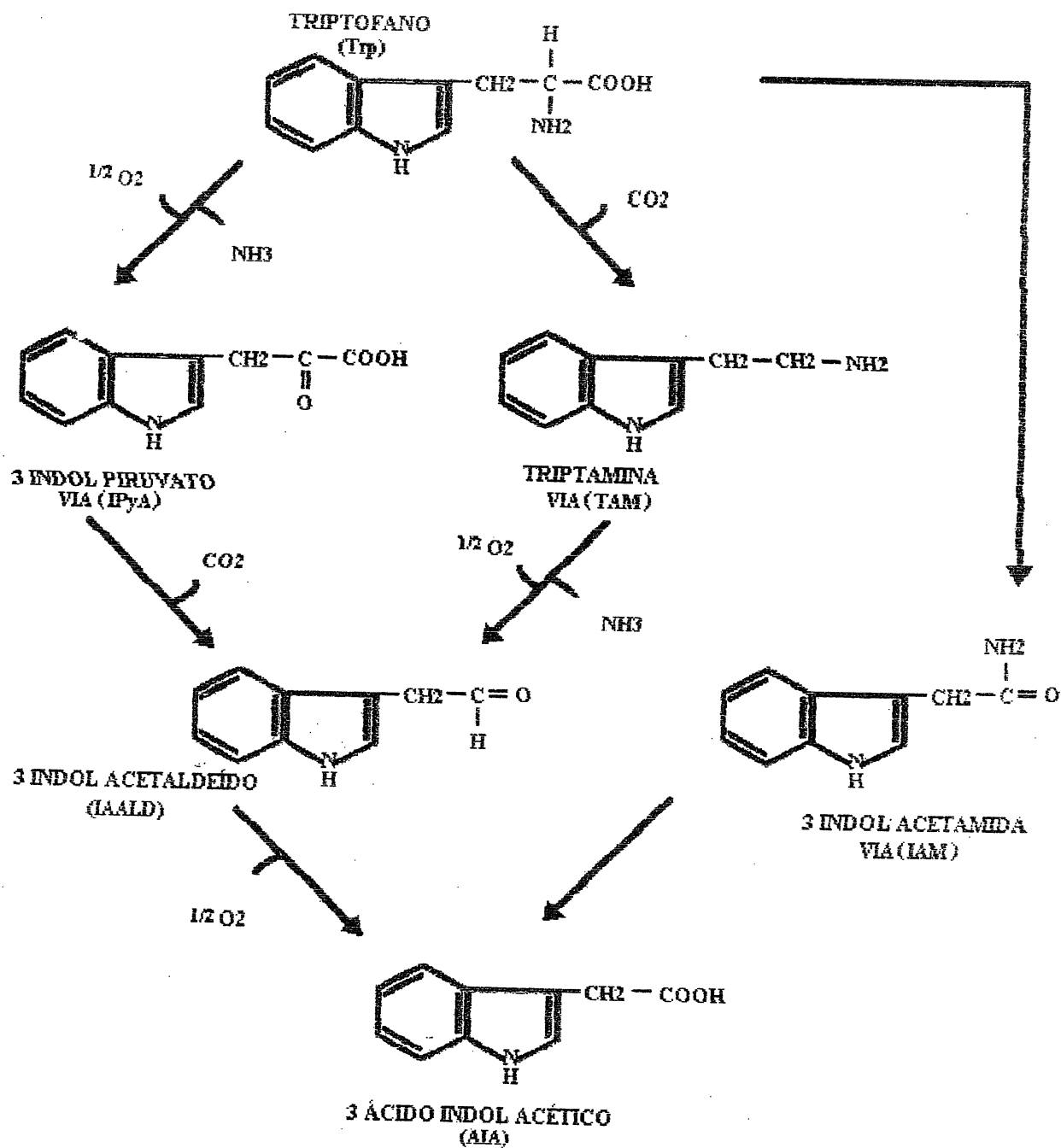
Além da produção em tecidos da planta, a síntese de AIA é difundida entre bactérias associadas à planta (PATTEN & GLICK 1996) e fornecem mecanismos com influência ao crescimento da planta.

A biossíntese do AIA em algumas bactérias é mostrada através de diferentes rotas biossintéticas (COSTACURTA *et al*, 1995; PATTEN & GLICK *et al*, 1996). A biossíntese do AIA Trp-dependente possui diversas vias, que são nomeadas geralmente após um intermediário, foi proposta: a via ácido indol-3-pirúvico (AIP), a via indol-3-acetamida (IAM), a via triptamina, e a via indol-3-acetaldoxima (IAOx). Em *Arabidopsis* purificou-se parcialmente *in vitro* um complexo enzimático capaz de converter o Triptofano em AIA (MÜLLER & WEILER, 2000a,b).

Um dos caminhos foi identificado como o indol 3-ácido pirúvico (AIPy): L-triptofano (Trp) → AIPy → indol-3-acetaldeído → AIA; pelo gene *ipdC* clonado do *Azospirillum brasilense* que codifica o AIPy-descarboxilase (COSTACURTA *et al*, 1995). Na primeira etapa desta rota, dois aminoácidos aminotransferases catalisam a transaminação do Trp (SOTO-URZUA *et al*, 1996). A enzima descarboxilase é uma enzima chave para a biossíntese do AIA em bactérias (PRINSEN *et al*, 1993).

Os genes AIA-induzíveis em algumas plantas superiores tem mostrado respostas também para auxinas sintéticas tais como o ácido naftalenoacético (ANA) e os ácidos clorofenoxi (SITBON & PERROT-RECHENMAMM, 1997). Para avaliar se o gene do *ipdC* de *Azospirillum brasilense* poderia ser induzido por outras auxinas, as culturas na fase de crescimento exponencial foram suplementadas com o ácido natural da auxina indol-3-butírico (AIB) ou com as auxinas sintéticas ANA, ácido 2,4-diclorofenoxipropiônico (2,4DP), ou o ácido p-clorofenoxiacético (4-CPA) e comparadas para a indução do *ipdC*. Nos três casos foi encontrada expressão do gene *ipdC*. Nas plantas, a conversão de AIB a AIA foi relatada (EPSTEIN & LUDWIG-MUUR, 1984; EPSTEIN & LAVEE, 1993), e não está ainda desobstruída se AIB é a própria auxina ou se exerce sua atividade da auxina com sua conversão a AIA (BARTEL & FINK, 1994). As análises bioquímicas em uma variedade das plantas e de estudos genéticos na *Arabidopsis* indicam que AIB age primeiramente com a conversão a AIA num processo parecido da oxidação  $\beta$  do ácido graxo (BARTEL *et al*, 2001), embora os papéis para AIB independente da conversão a AIA foram propostos (LUDWIG-MÜLLER, 2000; POUPART & WADDELL, 2000).

FIGURA 2. BIOSÍNTESE DO 3 ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) A PARTIR DO AMINOÁCIDO TRIPTOFANO.



## **2.OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

- Investigar a presença de promotores de crescimento semelhantes a auxinas em bactérias diazotróficas.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar as condições ideais de cultivo para a obtenção de auxinas através do uso do triptofano como precursor.
- Comparar diferentes variações do reagente de Salkowski na detecção do AIA e seus derivados no sobrenadante dos isolados.
- Quantificar a presença de auxinas nas bactérias diazotróficas, através de métodos espectrofotométricos.
- Comparar os resultados quantitativos de auxinas com as curvas de crescimento obtidas das linhagens testadas.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.LINHAGENS UTILIZADAS

As bactérias diazotróficas utilizadas no trabalho pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum* e *Rhizobium*.

O isolados da coleção de Olmar B. Weber do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB) da Embrapa – Seropédice, RJ (WEBER, 1998) foram isolados de caule, pseudocaule, folhas, raízes e frutos de abacaxizeiro, bananeira e palmeira oleaginosas cultivadas nos estados do Rio de Janeiro e Bahia e foram gentilmente cedidas.

As linhagens usadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1 e 2.

TABELA 1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS UTILIZADAS NO TESTE DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO AIA

MICROORGANISMO	HOSPEDEIRO	TECIDO	ORIGEM
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>			
BA153	bananeira	fruto	Itaguaí / RJ
X8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>			
AB7	abacaxizeiro	folhas	Cruz das Almas
BA15	bananeira	raiz	Cruz das Almas
BA14	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA161	bananeira	raiz	Itaguaí / RJ
BA149	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
BA16	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA10	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA11	bananeira	folhas	Cruz das Almas
BA12	bananeira	raiz	Cruz das Almas
BA17	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA134	bananeira	pseudocaule	Itaguaí / RJ
<i>Burkholderia spp</i>			
AB48	abacaxizeiro	raiz	Cruz das Almas
BA23	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA126	bananeira	raiz	Itaguaí / RJ
BA22	bananeira	folhas	Cruz das Almas
O1	bananeira	n.d.	Cruz das Almas



BA136	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
AB120	abacaxizeiro	caule	Macaé / RJ
AB71	abacaxizeiro	caule	Cruz das Almas
BA128	bananeira	fruto	Itaguaí / RJ
BA123	bananeira	raiz	Macaé / RJ
BA27	bananeira	folhas	Cruz das Almas
AB117	abacaxizeiro	raiz	Quissamã / RJ
BA25	bananeira	pseudocaulc	Cruz das Almas
BA88	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
BA104	bananeira	pseudocaulc	Itaguaí / RJ
<i>Burkholderia tropicalis</i>			
AB147	abacaxizeiro	caule	Quissamã / RJ
AB98	abacaxizeiro	fruto	Macaé / RJ
<i>Azospirillum</i> spp			
A1a	n.d.	n.d.	n.d.
A2a	n.d.	n.d.	n.d.
A8b	n.d.	n.d.	n.d.
A3b	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ochrobactrum</i> spp			
BA131	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
n.d.	nenhum dado		

Tabela 2. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS REFERÊNCIA UTILIZADAS NO TESTE DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO AIA

ESTIRPE	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
M4	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BALDANI et al., 1996b
M2	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BALDANI et al., 1986b
Z78	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BALDANI et al., 1986b
FP2	<i>Azospirillum brasilense</i>	RAMOS et al., 2002
Sp245	<i>Azospirillum brasilense</i>	MARTIN-DIDONET et al., 2000
CD-JA	<i>Azospirillum lipoferum</i>	MARTIN-DIDONET et al., 2000
Y1	<i>Azospirillum amazonense</i>	MARTIN-DIDONET et al., 2000
Y2	<i>Azospirillum amazonense</i>	MARTIN-DIDONET et al., 2000
Y6	<i>Azospirillum amazonense</i>	MARTIN-DIDONET et al., 2000
BR322	<i>Rhizobium tropici</i>	RAPOSEIRAS et al., 2002
BR112	<i>Sinorhizobium fredii</i>	SCHOLLA et al., 1984
BR5401	<i>Rhizobium spp</i>	CAMPELO et al., 1976
USDA4894	<i>Sinorhizobium teranga</i>	LAIJUDIE et al., 1995

### 3.2.CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As linhagens foram crescidas em meios específicos. O meio NFB HPN contendo malato como fonte de carbono foi usado para crescer os isolados AB7, AB117, AB120, BA10, BA11, BA12, BA14, BA17, BA27, BA106, BA123, BA128, BA134, A2a, A3b, A8b, X8, M2, M4 e Z78; NFB HPN contendo lactato como fonte de carbono para os isolados Ala, FP2, CDJA, Y1, Y2, Y6 e Sp245.

Os isolados BR112, BR322, BR5401, USDA4894 foram crescidos no meio específico TY e as linhagens AB71, AB98, BA22, BA23, BA25, BA88, BA104, BA126, BA136 e O1 no meio JMV.

Em todos os meios de cultura mencionados acima foram adicionados 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

A composição dos meios de cultura segue abaixo:

#### MEIO JMV (BALDANI & CARUSO, *et al* 1996a)

As quantidades são calculadas para 1 litro de meio de cultura:

Manitol	5,0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2,0 mL
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL
Fe EDTA solução 1,64%	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL

O pH foi ajustado para 4,2 – 4,5. Adicionado 100 mg de extrato de levedura, e autoclavado. Para este meio foram adicionados 10 mmol/ L de glutamato de sódio.

#### MEIO NFB HPN (MACHADO *et al.*, 1991)

As quantidades apresentadas são suficientes para o preparo de 1 litro de meio:

Ácido málico (lactato)	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL
Azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 N)	2,0 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL
KOH	4,5 g

O pH foi ajustado para 6,5 – 6,8 com NaOH.

#### MEIO TY (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994)

(meio para rizóbios em geral – crescem sem produzir muita goma)

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,87 g
Água deionizada (q.s.p.)	1L

Ajustou-se o pH para 6,8 – 7,2 com 1 N NaOH. A solução foi autoclavada por 15 min.

#### SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES PARA MEIO DE CULTURA (DÖBEREINER *et al.*, 1995a)

Quantidades suficientes para 200 mL de solução:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,235 g

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,28 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024 g

### SOLUÇÃO DE VITAMINAS PARA MEIO DE CULTURA (DÖBEREINER *et al.*, 1995a)

Quantidades suficiente para 100 mL de solução:

Biotina	10 mg
Piridoxol - HCl	20 mg

Dissolvidos em banho-maria.

Os inóculos foram obtidos pelo crescimento dos isolados de bactérias nos meios líquidos num período de 12 a 16 horas de incubação, sob agitação constante, a 120 rpm e na temperatura 30° C.

### **3.3.PREPARO DAS LINHAGENS PARA AVALIAÇÃO PELO REAGENTE DE SALKOWSKI**

Os pré-inóculos das linhagens M2, Z78 (*Herbaspirillum seropedicae*), M4 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), FP2, Sp245 (*Azospirillum brasilense*), CD-JA (*Azospirillum lipoferum*), Y1, Y2, Y6 (*Azospirillum amazonense*), BR322, BR112, BR5401 (*Rhizobium* spp) e USDA4894 (*Sinorhizobium saheli*) foram preparados a partir de estoque em meio sólido ou glicerol transferidos para frascos de 10 mL, contendo 3 mL de meio específico, incubados a 30°C, sob agitação (120 rpm), durante a noite (12 a 16 h). Cerca de 10 µL do pré-inóculo (Abs :1.0) foi transferido para frascos de 10 mL, contendo 5 mL de meio de cultura específico, com a adição de 100 µL/mL de D/L-triptofano (0,005 g/mL). Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação (120 rpm).

### 3.4. TESTE PARA PRODUÇÃO DO AIA E DERIVADOS PELO REAGENTE DE SALKOWSKI

Uma alíquota de 1 mL foi coletada da cultura e centrifugada a 5.000 rpm com o objetivo de baixar as células. O sobrenadante foi usado para o teste de produção do AIA e derivados em quatro variações do método de Salkowski:

- a) S1(1:1) - 1 mL de sobrenadante + 1 mL do reagente de Salkowski S1 (10,8 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com 4,5 g  $\text{FeCl}_3$ );
- b) S1(1:4) - 1 mL de sobrenadante + 4 mL do reagente de Salkowski S1 (10,8 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com 4,5 g  $\text{FeCl}_3$ );
- c) S2(1:1) - 1 mL de sobrenadante + 1 mL do reagente de Salkowski S2 (7,9 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com 12 g  $\text{FeCl}_3$ );
- d) S2(1:4) - 1 mL de sobrenadante + 4 mL do reagente de Salkowski S2 (7,9 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com 12 g  $\text{FeCl}_3$ );

As soluções foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente, durante 30 min.

### 3.5. SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DO AIA E DERIVADOS ATRAVÉS DO REAGENTE DE SALKOWSKI

Alíquotas das culturas das linhagens foram retiradas a cada 24 h, por um período de 96 h, e usadas para o teste de produção do AIA com o reagente de Salkowski com as quatro variações apresentadas no item 3.4.

As linhagens testadas pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, *Ochrobactrum* e *Rhizobium*.

### 3.6. QUANTIFICAÇÃO DO AIA E DERIVADOS PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As linhagens positivas para o teste de Salkowski, como descrito no item 3.6, foram novamente testadas a cada 12 h, durante 96 h, em triplicata, usando a variação do método S2 (1:1 v/v).

O processo de doseamento espectrofotométrico foi usado para a quantificação de AIA pelo reagente de Salkowski usando-o como método para detecção de AIA. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (FENTO) num comprimento de onda de 530 nm.

A quantificação foi feita por uma curva padrão a partir de uma solução de AIA contendo 1mg/mL. Padrões de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 8 µg/mL e 20 µg/mL foram preparados e suas absorvâncias (Abs) medidas a 530 nm.

### **3.7.QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA ATRAVÉS DO MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD, 1976)**

Uma alíquota de 100µL das culturas das linhagens M2, Z78 (*Herbaspirillum seropedicae*); M4 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*); FP2, Sp245 (*Azospirillum brasilense*); CD-JA (*Azospirillum lipoferum*); Y1, Y2, Y6 (*Azospirillum amazonense*); BR322, BR112, BR5401 (*Rhizobium* spp) e USDA4894 (*Sinorhizobium saheli*) foram retiradas a cada 24 h, por um período de 96 h, e transferidas para um tubo contendo 100µL de NaOH 0,25 mol/L para lisar as células e incubou-se por 30 min. em temperatura ambiente.

Em um tubo de ensaio transferiu-se 100µL da solução anterior e reagiu-se com 900µL de solução de Bradford e incubou-se por 30 min. a 37°C.

Quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford e foram analisadas no espectrofotômetro num comprimento de onda de 595nm e comparadas com uma curva padrão a partir de uma solução de BSA (Albumina Soror Bovina) 1mg/mL.

Os padrões de 1µg/100µL; 2µg/100µL; 5µg/100µL; 10µg/100µL foram preparados e suas absorvâncias mediadas a 595nm.

### **3.8.QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS POR MÉTODO ESPECTROFOTÔMETRO**

Foi efetuada leitura da absorvância. em comprimento de onda de 600nm das culturas M2, Z78 (*Herbaspirillum seropedicae*); M4 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*); FP2, Sp245 (*Azospirillum brasilense*); CD-JA (*Azospirillum lipoferum*); Y1, Y2, Y6 (*Azospirillum amazonense*); BR322, BR112, BR5401 (*Rhizobium* spp) e USDA4894 (*Sinorhizobium saheli*) durante o período de 96h.

Realizou-se um cultivo em triplicata da estirpe selecionada (Z78 *Herbaspirillum seropedicae*) em Erlenmeyer de 500mL, contendo 200mL de meio NFB-malato suplementado com 4mL da solução de D/L-triptofano.

Uma alíquota de 2mL da cultura foi mensurada por absorbância nos horários estipulados ( 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 24, 25, 26, 27, 32, 36 horas).

### **3.9. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SOBRENADANTE E CÉLULAS**

A linhagem selecionada (M2 *Herbaspirillum seropedicae*) foi crescida em grande escala, pois apresentou boa produção de fitohormônio. Procedeu-se o cultivo de cerca 2L de cultura contendo 4 mL da solução de D/L-triptofano (0,005 g/mL) com as mesmas condições de crescimento durante um período de 48 h.

Centrifugou-se a 5000 rpm com o objetivo de separar o sobrenadante. Este foi concentrado com o uso de um evaporador rotatório a 180 rpm / 50°C. O produto seco foi diluído com 10 mL de acetona e 5 mL de água destilada.

Parte desta amostra foi refrigerada para futuras análises de bioensaios e a outra passou por processos de purificação.

### **3.10. CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)**

Após procedimento destilação rápida a fim de remover o solvente, o resíduo seco foi diluído com 35 mL de propanol, transferido para uma coluna (3 cm de diâmetro x 18 cm de altura) contendo 25 mL de gel octyl-sepharose que foi acondicionado anteriormente com 60 mL de propanol 70%.

A coluna foi eluída inicialmente com água e posteriormente com propanol 70% e resultaram frações que foram liofilizadas, diluídas com acetona e analisadas pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD ou TLC) para a visualização e localização do AIA. Para tanto foi utilizado a mistura de solventes (propanol:H<sub>2</sub>O:amônia aquosa, 7:2.3:0.7 v/v) e os derivados do AIA revelados com o reativo de Salkowski.

As frações que se apresentaram positivas para o ácido indol acético foram reunidas em um só frasco e novamente utilizou-se outra coluna para a retirada de contaminantes e purificação.



Uma segunda coluna contendo sílica gel para a separação de substâncias mais polares, foi realizada com o intuito de promover uma maior interação entre os grupos hidrofílicos da amostra com os grupos silanol provenientes da fase estacionária. A amostra foi colocada no ápice da coluna e eluída com propanol em diversas concentrações (100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 e 50% v/v).

### **3.11.CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD OU TLC)**

As análises de CCD (cromatografia de camada delgada) foram realizadas em placas de sílica gel 60 Merck, sendo o solvente (propanol:H<sub>2</sub>O:amônia aquosa, 7:2.3:0.7, v/v). Todas as frações resultantes das colunas foram analisadas pela técnica de cromatografia de camada delgada que consiste em aplicações das amostras através de tubos capilares em uma das extremidades da placa de sílica, colocada em uma cuba de vidro contendo o solvente. Este procedimento foi utilizado na identificação do AIA.

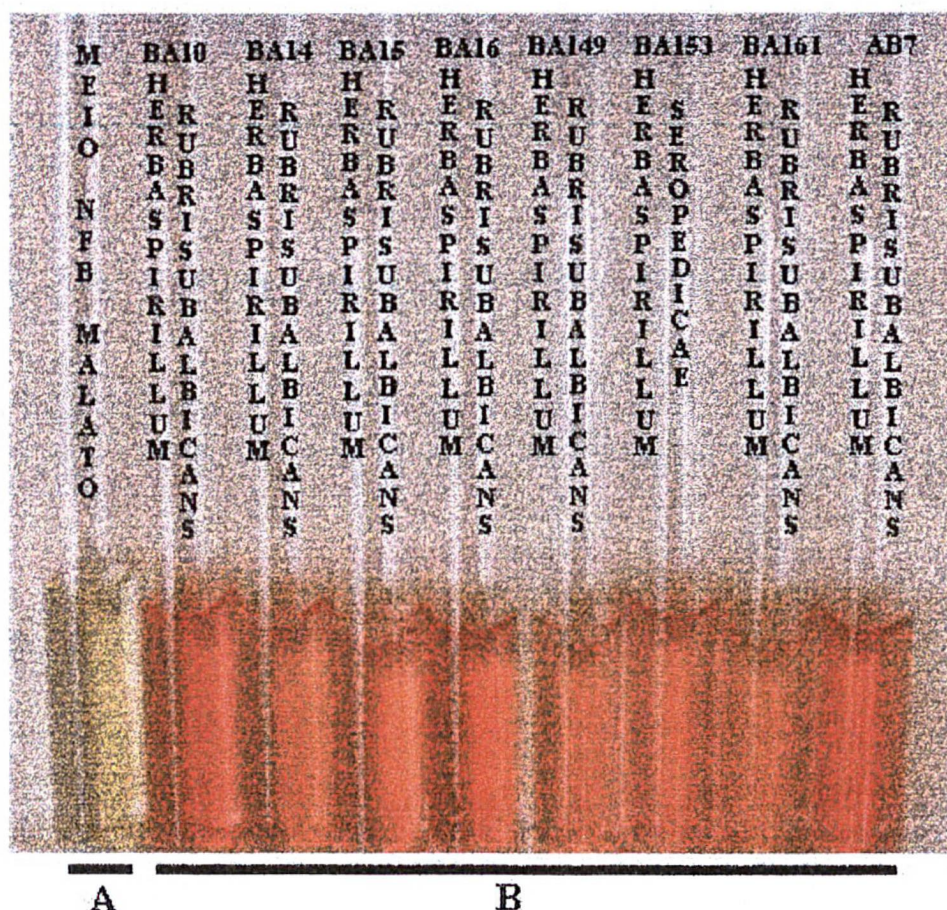
Para a revelação e a identificação do AIA foi utilizado o reagente de Salkowski que apresentou a melhor detecção e comparadas com uma solução de 1 mg/mL de ácido indol acético.

## **4.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1.TESTE DE SENSIBILIDADE DO REAGENTE DE SALKOWSKI NA IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO INDOL ACÉTICO**

Devido à sua facilidade, rapidez, sensibilidade e custo, o reagente de Salkowski tem sido largamente empregado na detecção do AIA produzido por bactérias diazotróficas e fitopatogênicas (BALOTA, *et al.*, 1995; CROZIER, *et al.*, 1988; HARTMANN, 1983; MASCARUA-ESPARZA, *et al.*, 1988; HALDA-ALIJA, 2003; PEDRAZA, *et al.*, 2004; RADWAN & MOHAMED, 1999; STEENHOUD & VANDERLEYDEN, 2000). O método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos (MAYER, 1958). A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowski resulta coloração amarelada para o teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo, como exemplificado na Figura 3.

FIGURA 3. TESTE DE SALKOWSKI EM AMOSTRAS DE *Herbaspirillum* spp. UTILIZANDO O REAGENTE S2 1:1 v/v



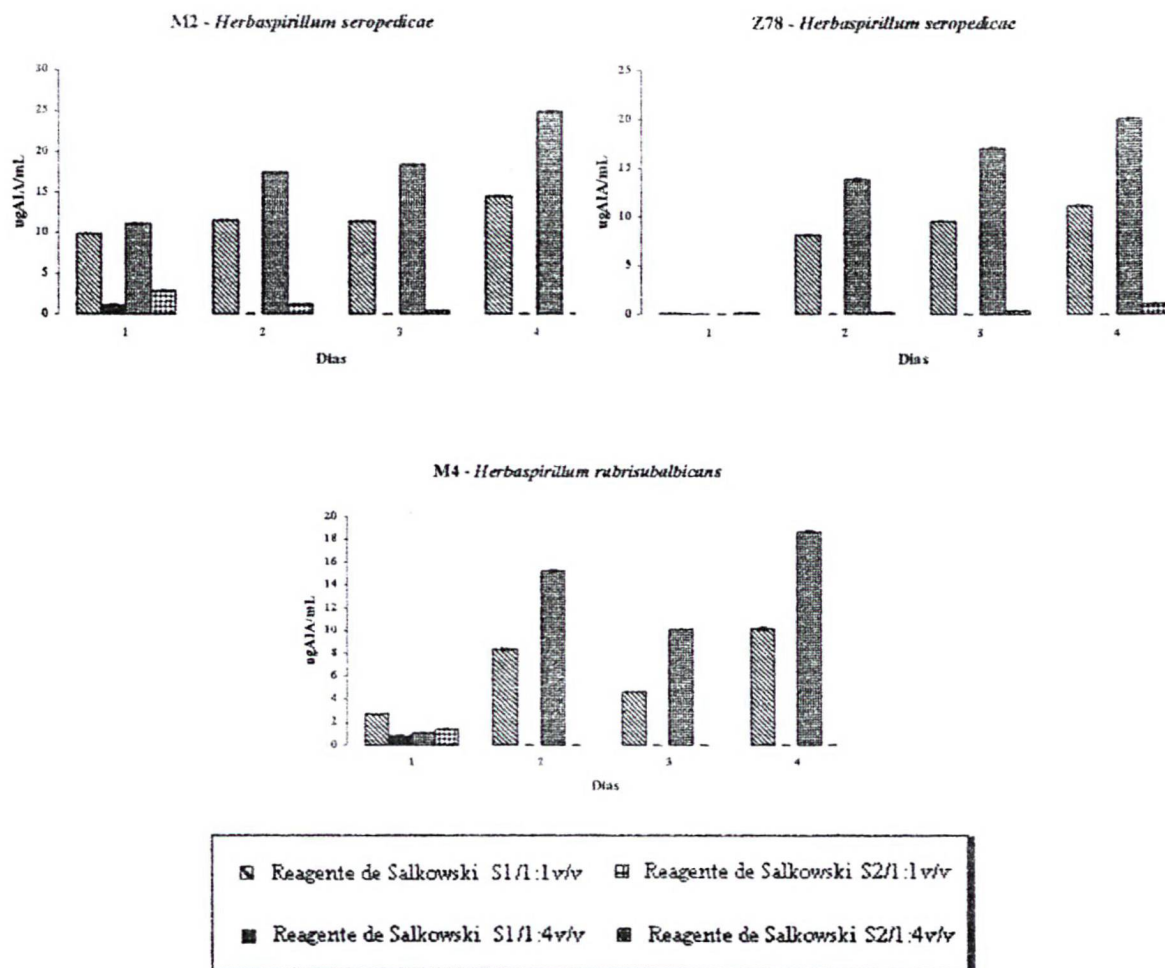
(A) Tubo de ensaio contendo 1 mL de meio NFB-malato e 1 mL de reagente de Salkowski S2 1:1v/v resultando em reação negativa para detecção do ácido indol acético. (B) Tubos contendo extratos de algumas linhagens de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BA10, BA14, BA15, BA16, BA149, BA161 e AB7) e *Herbaspirillum seropedicae* (BA153) testadas com o reagente de Salkowski S2 na proporção 1:1v/v, originando reação positiva para identificação do ácido indol acético.

Inúmeras variações para o teste de Salkowski (MAYER, 1958) são comumente encontradas na literatura para a detecção de compostos indólicos produzidos por bactérias, entre eles, AIA (GLICKMAN & DESSAUX, 1995; BALOTA, *et al.*, 1995; KENNEDY, comunicação pessoal). Para avaliar a sensibilidade de variações do teste encontradas na literatura, dois reagentes de Salkowski foram preparados (S1 e S2) e testados nas proporções (amostra:reagente) de 1:1v/v e 1:4v/v, em sobrenadantes de culturas das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum* spp e *Rhizobium* spp, sendo que as linhagens Sp245 (*Azospirillum brasilense*), Y1, Y2 e Y6 (*Azospirillum amazonense*) foram testadas com os reagentes S1 1:1v/v e S2 1:1v/v. Os resultados são mostrados nas figuras 4, 5 e 6. O reagente de Salkowski S1, na proporção de 1:4v/v (KENNEDY, comunicação pessoal) mostrou-se com baixa sensibilidade, não detectando a produção de AIA por parte de nenhuma das linhagens de bactérias condições testadas, exceto para as linhagens M2 de *Herbaspirillum seropedicae* e M4 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, mas em níveis muito baixos. Igualmente, o reagente S2, na proporção de 1:4v/v, também mostrou baixos níveis de detecção. Por outro lado, ambos os reagentes (S1 e S2), quando usados na proporção de 1:1v/v, foram capazes de detectar AIA em solução com alta sensibilidade. No quarto dia de incubação, linhagens de *Rhizobium* spp. apresentaram reação negativa para os dois reagentes em ambas proporções utilizadas. Devido aos maiores níveis de detecção de AIA por parte do reagente S2, este foi escolhido para as análises subseqüentes (Figuras 4, 5 e 6).

Apesar dos reagentes testados não terem sido capazes de detectar AIA quando usados na proporção de 1:4v/v, esta e outras proporções volumétricas de reagente e amostra são comumente usados (KENNEDY, comunicação pessoal; GLICKMANN & DESSAUX, 1995). É possível que diversas condições do teste possam estar influenciando os resultados obtidos. KENNEDY (comunicação pessoal) usou o reagente S1 1:4v/v em culturas de bactérias em meio líquido, crescendo em placas de 96 poços. GORDON & WEBER (1951) e TANG *et al* (1947) testaram proporções de 1,5:1v/v e 1:4v/v, mas usaram ácido sulfúrico na concentração de 0,5 mol/L para a proporção de 1:4v/v. Estes autores estabeleceram o teste na proporção de 1,5:1v/v como sendo a mais sensível. MINAMISAWA, *et al.*, (1992) e RADWAN *et al.* (2004) adotaram o reagente de Salkowski 0,01mol/L de FeCl<sub>3</sub> em 35% de HClO<sub>4</sub> na proporção 1:2v/v para identificar a produção de AIA em linhagens de *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., respectivamente. Variações no reagente de Salkowski, onde HClO<sub>4</sub> é usado no lugar do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, também são comumente encontradas.

BA136	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
AB120	abacaxizeiro	caule	Macaé / RJ
AB71	abacaxizeiro	caule	Cruz das Almas
BA128	bananeira	fruto	Itaguaí / RJ
BA123	bananeira	raiz	Macaé / RJ
BA27	bananeira	folhas	Cruz das Almas
AB117	abacaxizeiro	raiz	Quissamã / RJ
BA25	bananeira	pseudocaule	Cruz das Almas
BA88	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
BA104	bananeira	pseudocaule	Itaguaí / RJ
<b><i>Burkholderia tropicalis</i></b>			
AB147	abacaxizeiro	caule	Quissamã / RJ
AB98	abacaxizeiro	fruto	Macaé / RJ
<b><i>Azospirillum</i> spp</b>			
A1a	n.d.	n.d.	n.d.
A2a	n.d.	n.d.	n.d.
A8b	n.d.	n.d.	n.d.
A3b	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Ochrobactrum</i> spp</b>			
BA131	bananeira	folhas	Itaguaí / RJ
n.d. – nenhum dado			

FIGURA 4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Herbaspirillum* USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE. \*



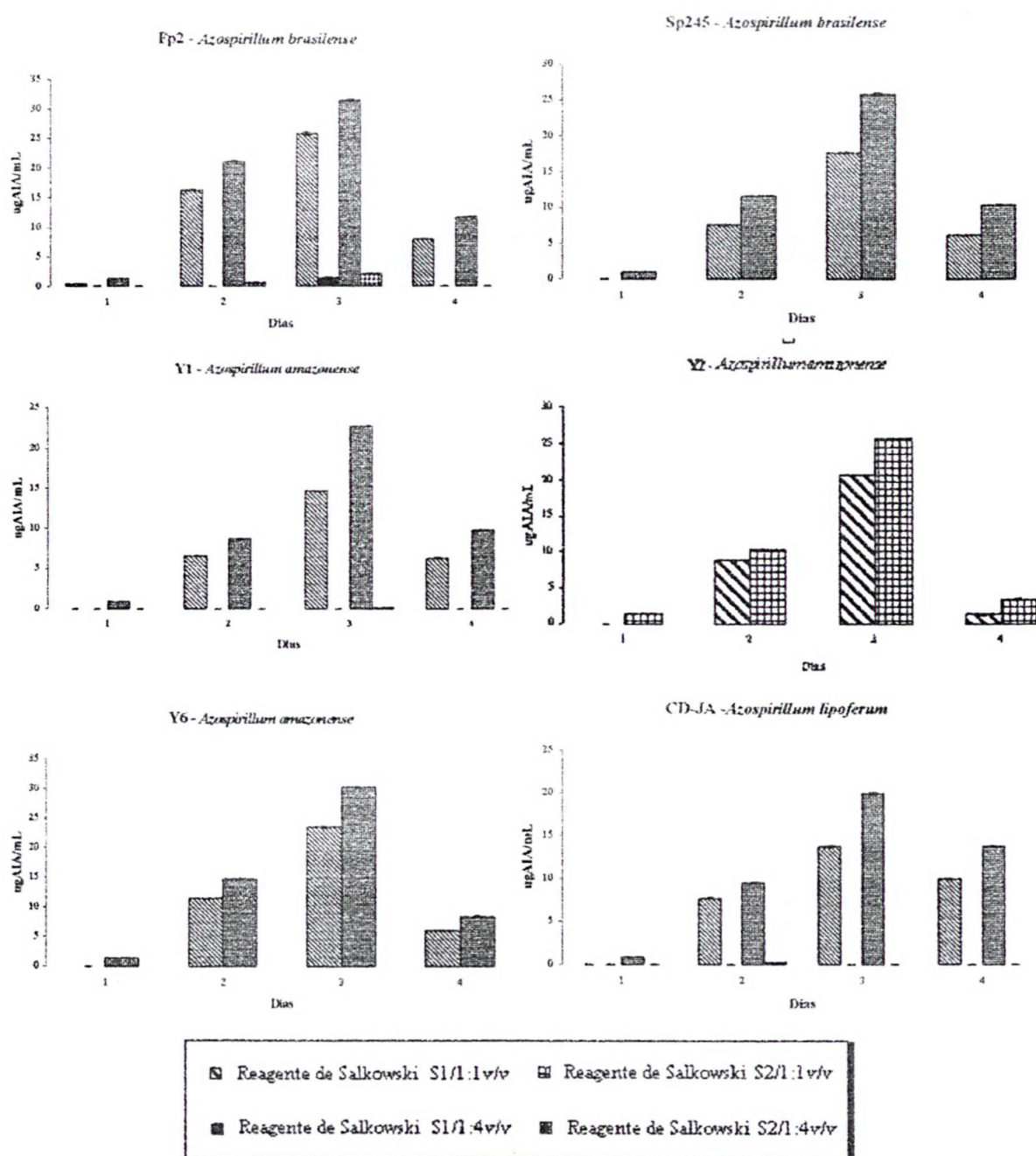
S1/1:1 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S1/1:4 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S2/1:1 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ); S2/1:4 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ).

\* As concentrações representam a média de três repetições.

A concentração de AIA em  $\mu g/mL$  foi determinada de acordo com o método descrito em 3.4 e 3.6 de Material e Métodos.



FIGURA 5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum* USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE.\*

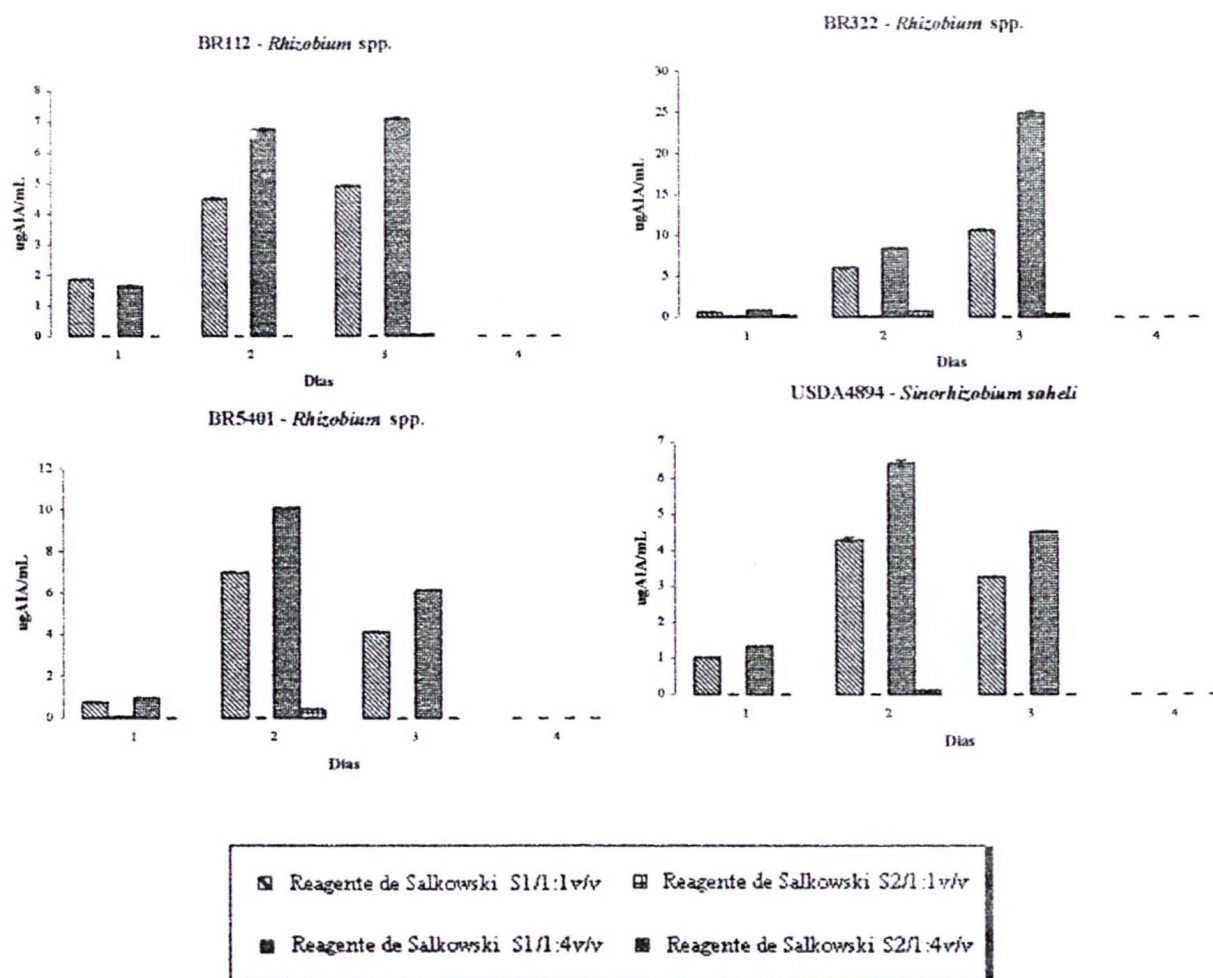


S1/1:1 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S1/1:4 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S2/1:1 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ); S2/1:4 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ).

\* As concentrações representam a média de três repetições

A concentração de AIA em  $\mu g/mL$  foi determinada de acordo com o método descrito em 3.4 e 3.6 de Material e Métodos.

FIGURA 6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AIA PRODUZIDO POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Rhizobium* USANDO DUAS VARIAÇÕES DO REAGENTE DE SALKOWSKI (S1 E S2) E DUAS PROPORÇÕES DE AMOSTRA/REAGENTE.\*



S1/1:1 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S1/1:4 (10,8 mol/L de  $H_2SO_4$  com 4,5 g  $FeCl_3$ ); S2/1:1 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ); S2/1:4 (7,9 mol/L de  $H_2SO_4$  com 12 g  $FeCl_3$ ).

\* As concentrações representam a média de três repetições

A concentração de AIA em  $\mu g/mL$  foi determinada de acordo com o método descrito em 3.4 e 3.6 de Material e Métodos.



#### 4.2. PRODUÇÃO DE AIA E DERIVADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIATIVAS

Isolados diazotróficos endofíticos associados a abacaxizeiro, bananeira e palmeiras oleaginosas foram caracterizados molecularmente por técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e seqüenciamento parcial do gene que codifica para o RNA ribossomal de 16S (16S rRNA) por CRUZ *et al* (2001). De acordo com este autor, os isolados foram identificados da seguinte forma: *Herbaspirillum seropedicae* (BA153 e X8), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (AB7, BA15, BA14, BA161, BA149, BA16, BA10, BA11, BA12, BA17 e BA134), *Burkholderia tropicalis* (AB147 e AB98), *Burkholderia* spp (AB48, BA23, BA126, BA22, O1, BA136, AB120, AB71, BA128, BA123, BA27, AB117, BA25, BA88, BA104), *Azospirillum* spp (A1a, A2a, A8b e A3b) e *Ochrobactrum* spp (BA131). A produção de AIA e compostos indólicos foi determinada, para estes isolados, através do método de Salkowski utilizando o reagente S2, na proporção 1:1v/v, por ter mostrado melhor sensibilidade (item 4.1). O teste foi realizado de acordo com o item 3.3 de Material e Métodos em 4 diferentes tempos de crescimento das culturas: nas primeiras 24h após a inoculação (primeiro dia), no intervalo de 24 a 48h (segundo dia), no intervalo entre 48 e 72h (terceiro dia) e no intervalo entre 72 a 96h (quarto dia). Os resultados obtidos para a produção de compostos indólicos são mostrados na Tabela 3.

Os isolados de *Herbaspirillum* produziram AIA a partir do primeiro dia de crescimento, em média 12 µg de AIA/mL de cultura, com exceção da linhagens BA134 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, que apresentou níveis muito baixos de produção de AIA (0,75 µg de AIA/mL). Durante os dias subseqüentes, houve acúmulo de AIA para algumas linhagens (X8, BA12), enquanto outras (BA153, AB7, BA15, BA14, BA16, BA10) mostraram uma diminuição na sua concentração.

BASTIÁN *et al* (1998) realizou experimentos com linhagens de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) e *Azotobacter* spp crescidas durante 48 horas e observou através de análises de GC-SM que as bactérias produziram AIA observado também nas linhagens *Herbaspirillum seropedicae* testadas neste trabalho de pesquisa.

De acordo com os dados obtidos das linhagens do gênero *Burkholderia*, observou-se que no primeiro dia houve produção média de 1,7µg de AIA/mL de cultura, havendo, no segundo dia, acúmulo de AIA produzido para algumas bactérias (AB48 e BA123). Entretanto,

BA27, AB117, BA22 e BA23 demonstraram produção de AIA no primeiro dia e nos posteriores não se detectaram níveis de ácido indol acético e derivados, estes resultados sugerem um consumo do AIA como fonte de carbono ou nitrogênio.

No sobrenadante das culturas das bactérias AB147, AB98, BA126, BA136, AB120, AB71, BA128, BA25, BA88, BA104 e O1 não foi detectada a produção de AIA e derivados.

Linhagens do gênero *Burkholderia* têm apresentado habilidade de produção de promotores de crescimento, visto que os dados obtidos neste experimento e nos estudos realizados por SOBRAL *et al* (2004) vieram a confirmar.

Na avaliação de produção de AIA e derivados nas linhagens do gênero *Azospirillum* constatou-se, em média, uma produção de 9,47µg AIA/mL no primeiro dia, sendo que no segundo dia essa produção foi em média de 43,4µg AIA/mL, ou seja, 358% a mais que no primeiro dia.

A bactéria A1a apresentou acúmulo de 2,4µg de AIA/mL no quarto dia. Já na bactéria A2a não se detectaram níveis de AIA nos dias seguintes a partir da primeira amostragem.

O isolado (BA131) do gênero *Ochrobactrum* apresentou acúmulo de 5,36µg de AIA/mL no segundo dia constatando-se nos subseqüentes, diminuição na concentração de AIA e derivados produzidos.

BALOTA *et al.* (1995) observaram que bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de mandioca, *Azospirillum lipoferum* e *Klebsiella* spp acumularam AIA após a fase log de crescimento (cerca de 24h) até 72h. Entre 72h e 120h de crescimento, observaram diminuição nos níveis de AIA, o que também foi observado no presente trabalho de pesquisa para a maioria das estirpes (Tabela 2). Segundo os dados da Tabela 2 as linhagens A3b e A8b *Azospirillum* spp demonstraram 75,27ug de AIA/mL e 54,40ug de AIA/mL no segundo dia de incubação. Estes valores foram superiores aos encontrados por CROZIER *et al* (1988) que através do método colorimétrico de Salkowski detectou nas linhagens de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* concentrações de 26,1ug de AIA/mL e 10,5ug de AIA/mL respectivamente.

Estudos realizados por PEDRAZA *et al* (2004) revelaram que as linhagens de *Azospirillum* produziram níveis elevados de indóis, sendo que a bactéria UAP14 *Azospirillum brasilense* apresentou 27,36ugAIA/mg de proteína, sendo o maior valor obtido.

MASCARUA ESPARZA *et al.* (1988) detectaram 28,54 a 97,3µM/mL de AIA em linhagens de *Azospirillum lipoferum* isolados de plantas cactaceas do México.

RADWAN *et al* (2004) recentemente comunicou que diversas linhagens de *Azospirillum* produziram quantidades diferentes de compostos indólicos, sendo que as espécies de *Azospirillum brasilense* mostraram níveis elevados em relação as espécies de *Azospirillum lipoferum*. Este estudo ainda mostrou que as linhagens de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67 e M4) demonstraram uma produção de AIA menor que as linhagens de *Azospirillum* sp (CD e Br17).

As bactérias estudadas no presente trabalho de pesquisa apresentaram capacidade diferenciada de produzir AIA, dados estes também constatado anteriormente por TIEN *et al.* (1979) e por HARTMANN *et al* (1983).

TABELA 3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS POR TRINTA E CINCO LINHAGENS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, USANDO MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM TRIPTOFANO.

Linhagens	Pontos de Amostragem*			
	AIA µg/mL ± D.P.			
	1º. dia	2º. dia	3º. dia	4º. dia
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>				
BA153	19,47 ±0,066	10,19 ±0,093	4,74 ±0,020	18,64 ±0,141
X8	14,86 ±0,060	25,42 ±0,151	25,63 ±0,244	31,52 ±0,101
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>				
AB7	23,61 ±0,031	9,06 ±0,013	5,52 ±0,031	6,18 ±0,041
BA15	19,63 ±0,025	10,32 ±0,075	8,62 ±0,085	5,80 ±0,077
BA14	17,25 ±0,030	8,35 ±0,080	9,92 ±0,065	12,75 ±0,103
BA161	11,45 ±0,107	22,36 ±0,089	16,54 ±0,084	11,11 ±0,025
BA149	13,50 ±0,062	9,72 ±0,196	14,66 ±0,192	11,42 ±0,082
BA16	19,33 ±0,015	10,55 ±0,085	10,8 ±0,041	6,08 ±0,056
BA10	17,82 ±0,043	8,22 ±0,080	8,63 ±0,048	9,40 ±0,074
BA11	13,57 ±0,046	18,18 ±0,075	20,26 ±0,107	14,03 ±0,051
BA12	18,67 ±0,026	19,80 ±0,045	22,16 ±0,126	29,90 ±0,195
BA17	15,80 ±0,036	20,95 ±0,059	29,33 ±0,141	20,42 ±0,106
BA134	0,75 ±0,004	0,0 <sup>+</sup>	0,0	0,0
<i>Burkholderia tropicalis</i>				
AB147	0,0	0,0	0,0	0,0
AB98	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Burkholderia spp</i>				
AB48	1,34 ±0,013	2,70 ±0,024	1,35 ±0,016	0,42 ±0,007
BA23	0,84 ±0,015	0,0	0,0	0,0
BA126	0,0	0,0	0,0	0,0
BA22	1,57 ±0,015	0,0	0,0	0,0
O1	0,0	0,0	0,0	0,0
BA136	0,0	0,0	0,0	0,0
AB120	0,0	0,0	0,0	0,0
AB71	0,0	0,0	0,0	0,0
BA128	0,0	0,0	0,0	0,0
BA123	0,48 ±0,008	10,02 ±0,086	12,05 ±0,081	7,91 ±0,092
BA27	4,06 ±0,145	0,0	0,0	0,0
AB117	2,12 ±0,016	0,0	0,0	0,0
BA25	0,0	0,0	0,0	0,0
BA88	0,0	0,0	0,0	0,0
BA104	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Azospirillum spp</i>				
A1a	0,0	0,53 ±0,025	2,02 ±0,020	2,40 ±0,016
A2a	0,58 ±0,002	0,0	0,0	0,0
A8b	5,47 ±0,035	54,40 ±0,059	41,28 ±0,165	32,41 ±0,070
A3b	23,27 ±0,1	75,27 ±0,39	52,69 ±0,345	37,03 ±0,71
<i>Ochrobactrum spp</i>				
BA131	5,01 ±0,028	5,36 ±0,013	4,02 ±0,014	2,55 ±0,008

Meios suplementados com 100 µL/mL de D/L-triptofano na concentração de 0,005 g/mL, média de três repetições.

\* Pontos de Amostragem: 1. amostragem feita durante o primeiro dia de crescimento das culturas após a inoculação, entre 19 e 20h; 2. amostragem feita no segundo dia após a inoculação, entre 30 e 47h; 3. amostragem feita no terceiro dia após a inoculação, entre 50 e 70h; 4. amostragem feita no quarto dia após a inoculação, entre 84 e 97h

D.P. (Desvio Padrão), + níveis de AIA não detectado pelo método.

De acordo com BALOTA *et al.* (1995), não houve produção de AIA, em níveis detectáveis, anterior à fase logaritmica de crescimento mostrado pelas linhagens diazotróficas testadas. Medidas de absorbância (600nm) e AIA para linhagens de *Herbaspirillum*, mostraram que no primeiro e segundo dias, com aproximadamente 20 e 30h de crescimento, respectivamente, houve aumento da absorbância e produção de AIA, sugerindo que este último foi produzido na fase log de crescimento.

De acordo com OMay *et al.* (1993) o aumento que ocorre na concentração de AIA no final da fase log de crescimento, resulta do metabolismo das bactérias nesta etapa de desenvolvimento, também observado neste experimento.

Entretanto, algumas bactérias testadas nesta pesquisa apresentaram diminuição na concentração de AIA, sugerindo que estas o tenham utilizado como fonte de carbono ou mesmo, como fonte de nitrogênio.

Por outro lado, foram, também detectadas linhagens nas quais a produção de AIA diminuiu, aumentando contudo, em sua concentração nos dias posteriores. Estudos sugerem que o aumento deve-se ao triptofano liberado das células mortas que estimulariam a produção de auxinas (ZIMMER & BOTHE, 1988).

A produção de AIA foi avaliada em relação à concentração de proteína nas culturas de *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Rhizobium* durante quatro dias de crescimento, sendo feita uma amostragem por dia. A curva de crescimento foi acompanhada pela absorbância. (Figura 7, 8 e 9). Foi observado acúmulo de AIA no terceiro dia. A partir do segundo dia, a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento. Do terceiro para o quarto dia, apesar de ter sido observada diminuição na produção de AIA em relação a quantidade de proteína, a concentração de AIA detectada aumentou de 17,12 para 20,18 µg/mL.

Observou-se no isolado de *Herbaspirillum seropedicae* M2 que a produção de AIA em relação à proteína ocorreu no segundo dia durante quatro dias de crescimento, sendo que do segundo ao terceiro dia a cultura M2 atingiu uma curta fase estacionária de crescimento. Já na bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (M4) a curva de crescimento foi observada pela absorbância ocorrendo acúmulo de AIA em relação à concentração de proteína, e no último dia de amostragem (Figura 7).

A produção de AIA em relação à concentração de proteína, foi avaliada na cultura de *Azospirillum* onde foram feitas 4 amostragens nas bactérias: Y1, Y2, Y6, SP245 e CD-JA que demonstraram um acúmulo no terceiro dia. Entretanto, a partir do terceiro dia, as espécies

CD-JA (*Azospirillum lipoferum*) e a SP245 (*Azospirillum brasilense*) apresentaram breve fase estacionária de crescimento, e a CD-JA, após esta fase, entrou em declínio, observando diminuição na concentração de AIA em relação à concentração de proteína (Figura 8).

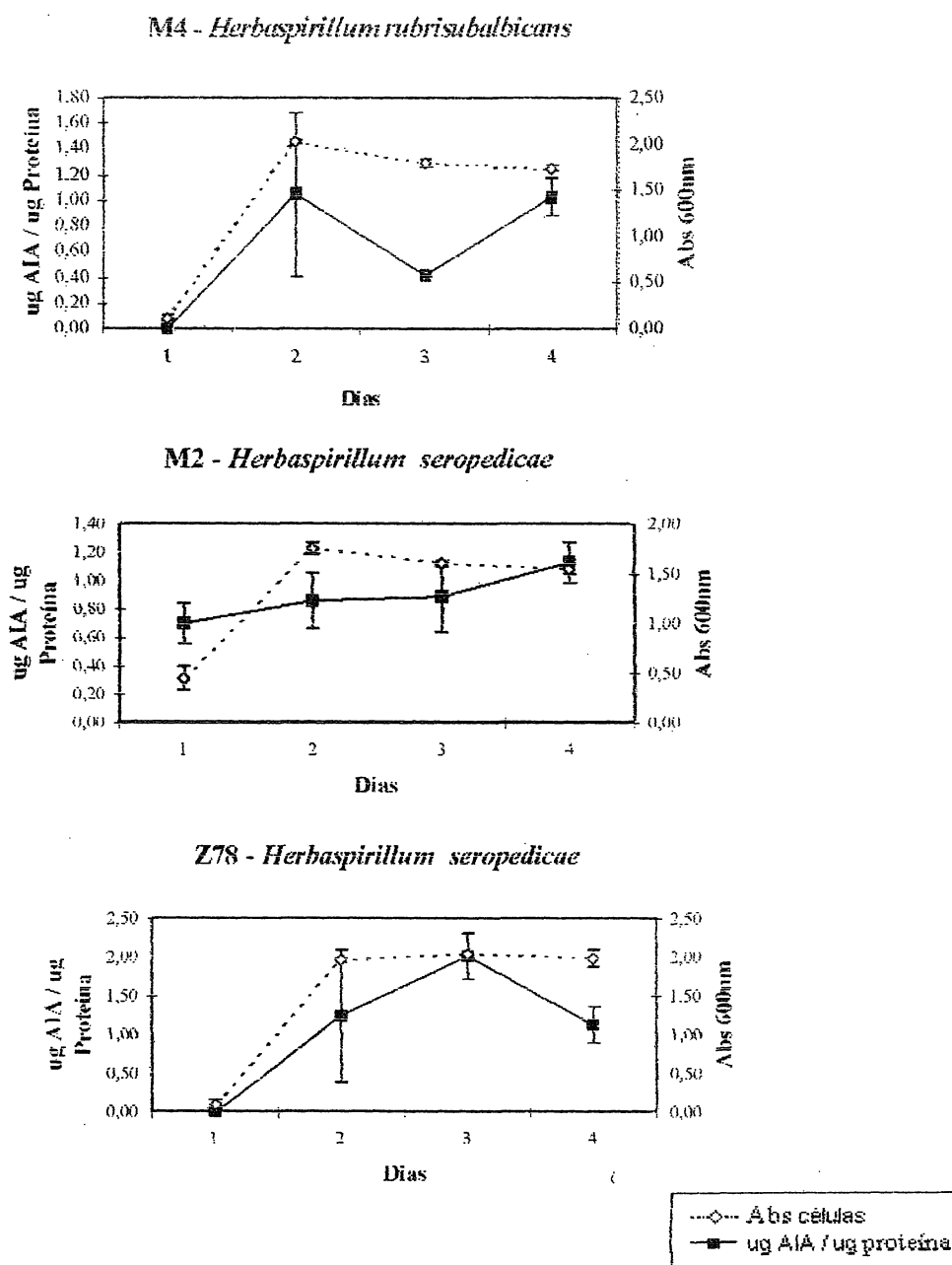
No gênero *Rhizobium*, observou-se que a maior concentração de AIA em relação à proteína, nas bactérias BR112, USDA4894 e BR5401 ocorreu no segundo dia de crescimento. Já a linhagem BR322 apresentou acúmulo de AIA, em relação à proteína, no terceiro dia.

As linhagens BR322, BR112, BR5401 e USDA4894, demonstraram declínio de AIA, em relação à proteína, a partir do segundo dia. No entanto, a concentração detectada nas linhagens BR5401 e USDA4894 no terceiro e no quarto dia foram de 0,27 para 0,17µg/mL e 0,18 para 0,12µg/mL respectivamente.

Não houve detecção de AIA em relação à concentração de proteína do terceiro para o quarto dia na linhagem BR5401, enquanto que nas bactérias USDA4894, BR112 e BR322 esse dado foi observado no quarto dia (Figura 9).

Foi sugerido por Omay *et al* (1993) que também o incremento na produção de AIA por *Azospirillum* acontece pela exaustão de carbono no meio, e que em condições de rizosfera, em forte competição pelos substratos orgânicos rejeitados pelas raízes poderia estimular a produção de AIA. Dados colhidos por NARAYANASWAMI & VEERRAJU (1996) detectaram uma quantidade três vezes maior de AIA na rizosfera.

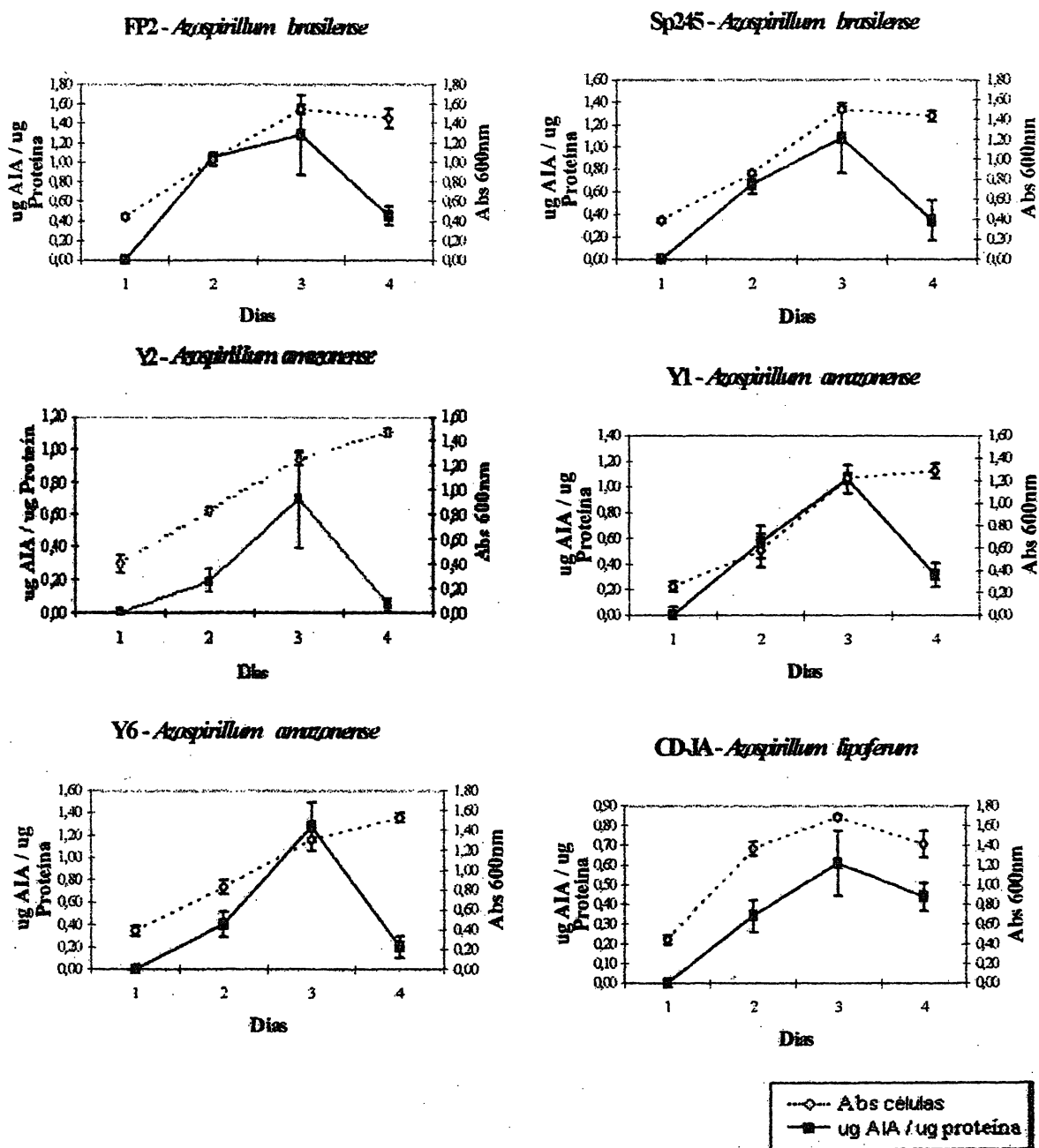
FIGURA 7. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *Herbaspirillum*.\*



\* Os resultados representam a média de três repetições.

A concentração de  $\mu\text{g AIA}/\mu\text{g proteína}$  e a absorbância foram determinadas de acordo com os métodos descritos em 3.7 e 3.8 respectivamente de Material e Métodos.

FIGURA 8. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *Azospirillum*. \*

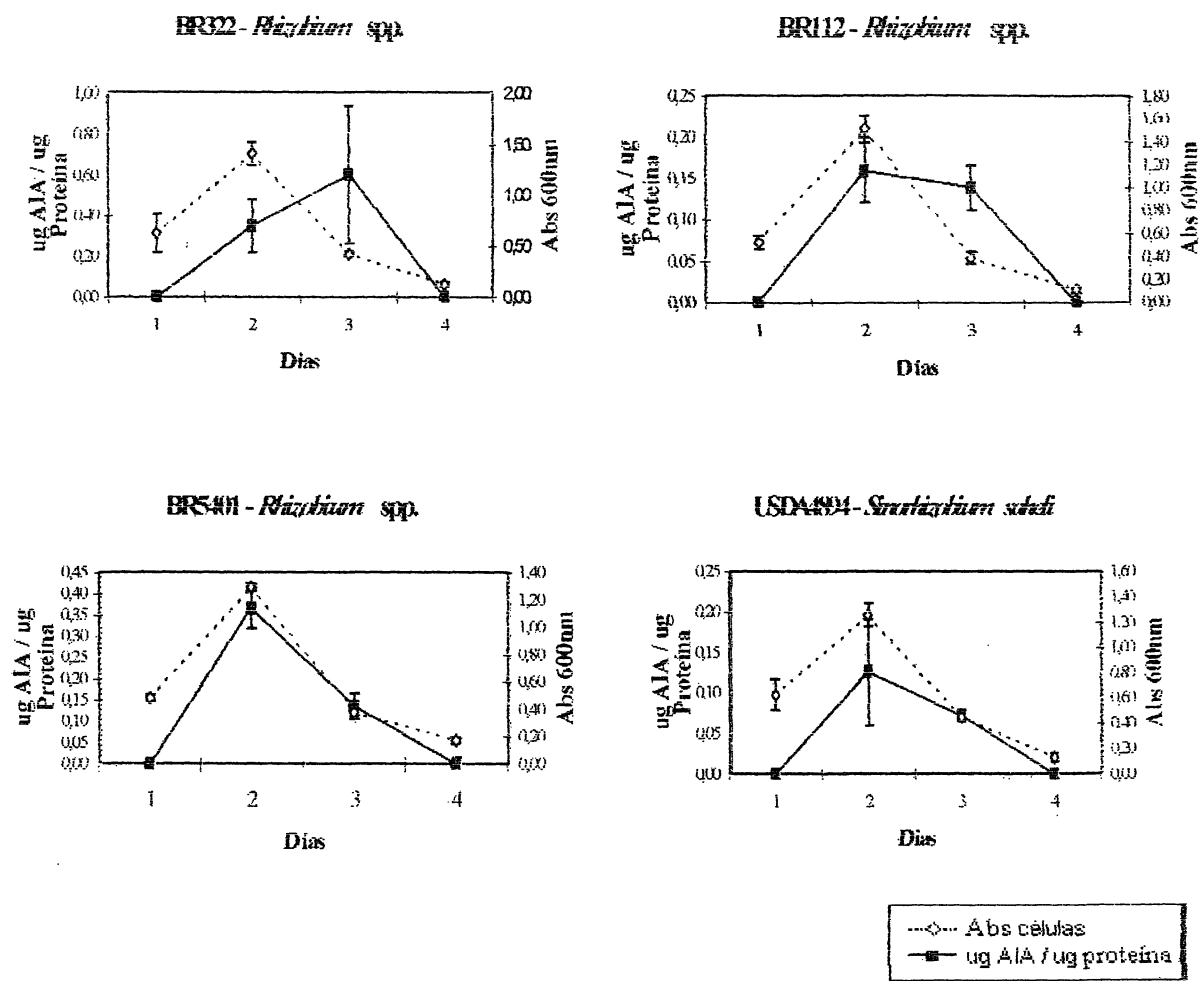


\* Os resultados representam a média de três repetições.

A concentração de  $\mu\text{g AIA}/\mu\text{g proteína}$  e a absorvância foram determinadas de acordo com os métodos descritos em 3.7 e 3.8 respectivamente de Material e Métodos.



FIGURA 9. PRODUÇÃO DE AIA EM REALAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *Rhizobium* \*



\* Os resultados representam a média de três repetições.

A concentração de  $\mu\text{g AIA}/\mu\text{g proteína}$  e a absorvância foram determinadas de acordo com os métodos descritos em 3.7 e 3.8 respectivamente de Material e Métodos.

#### 4.3.ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE AIA E DERIVADOS EM RELAÇÃO À PROTEÍNA NA LINHAGEM Z78 DE *Herbaspirillum seropedicae*.

O monitoramento da absorbância (600nm) e produção de AIA e derivados foi avaliada em relação à concentração de proteína na cultura de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 durante 36h de crescimento, sendo feitas amostragens de acordo com o item 3.9. A curva de crescimento foi acompanhada pela leitura da absorbância a 600nm (Figura 10). Durante este período, a cultura não entrou na fase estacionária de crescimento. A linhagem passou a produzir AIA a partir de aproximadamente 15 horas de incubação.

Foi observado um acúmulo de 26,7µg de AIA em relação à proteína em 24 horas, ocorreu no início da fase log de crescimento. No intervalo seguinte, houve diminuição na produção de AIA, chegando a 20,63 µg AIA/ µg de proteína em 36h. Durante as 15 primeiras horas observou-se que a bactéria encontrava-se na fase lag. A fase logarítmica começou após 15 horas e foi até aproximadamente 35 horas, a partir de onde a cultura, aparentemente, começou a entrar na fase estacionária.

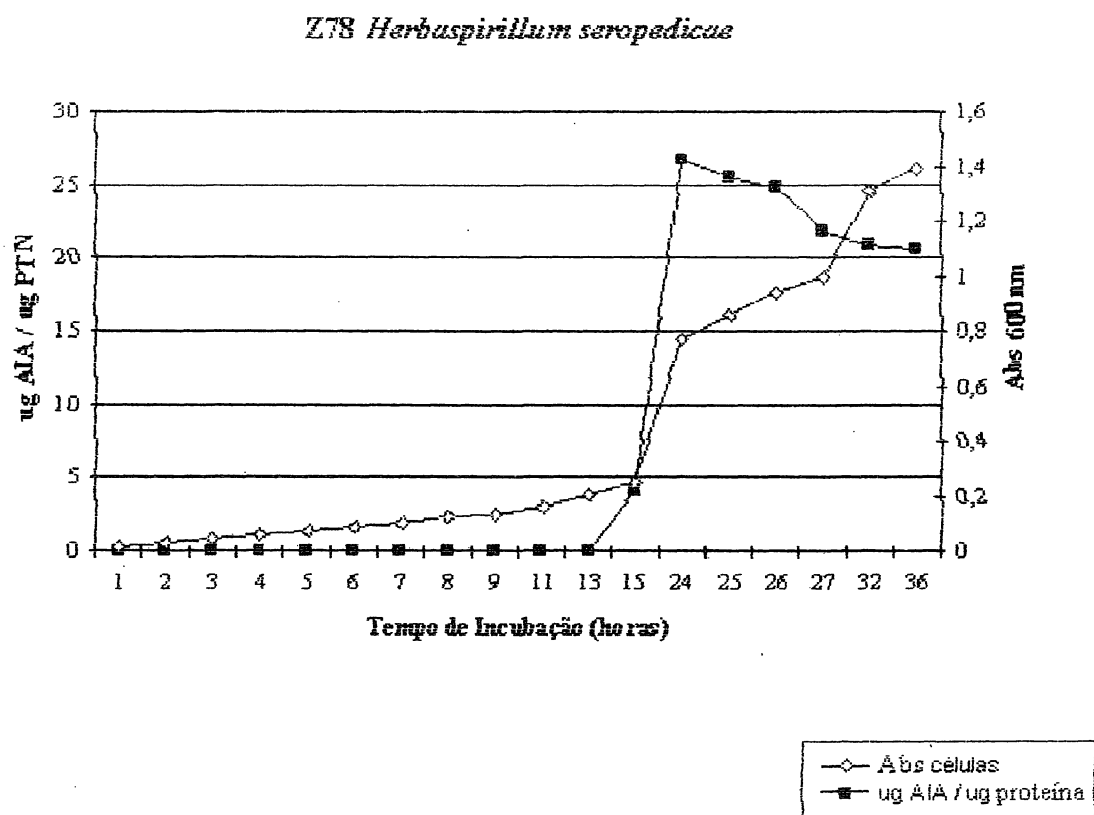
A linhagem Z78, quando cultivada em frasco (Figura 7) apresentou níveis de AIA e derivados menores que a Z78 crescida em Erlenmeyer (Figura 10). Esses dados sugerem que a diferença na produção do AIA pode ter sido influenciado pelos níveis de aeração da cultura, uma vez que a área, em relação ao volume, é de 27,06µg AIA/mL no frasco e de 29,78µg AIA/mL no Erlenmeyer.

SCHWAB (comunicação pessoal) levou a efeito o crescimento de *H. seropedicae* estirpe Z78 em placa de 96 poços (*deep-well block*) e observou um pico de produção de AIA em relação à absorbância em 6h (17,07 µg AIA/ proteína. - Figura12, Anexo 7). Após este período, houve diminuição na produção de AIA, chegando a 5,39 µg AIA/ proteína. O crescimento das culturas foi acompanhado pela medida da absorbância. e mostrou-se diferente nos dois casos. Para a cultura em Erlenmeyer, houve uma fase lag mais longa, possivelmente devido ao volume de inóculo usado em relação ao volume de meio. Neste teste, inoculou-se 1,5 mL do pré-inóculo em Erlenmeyer e 24 µL para crescimento em placa, ambos volumes provenientes da mesma cultura. Na fase logarítmica, o crescimento foi acentuadamente maior na cultura em Erlenmeyer, possivelmente, devido à maior aeração, pois a área em relação ao volume de meio do Erlenmeyer foi de 29,78µg AIA/mL, sendo maior que a área em relação ao volume encontrada em placa com 2,7µg AIA/mL. É possível que o pico de produção de

ALA, na cultura em Erlenmeyer, tenha ocorrido tardiamente devido ao deslocamento para a direita da curva de crescimento.

Ambos experimentos apresentaram uma curva de crescimento similar nas primeiras 36 horas após a inoculação, onde mostraram intensa atividade de crescimento, o qual começou a se estabilizar após 36 horas, possivelmente quando atingiram a fase estacionária.

FIGURA 10. PRODUÇÃO DE AIA EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E CRESCIMENTO DA LINHAGEM Z78 *Herbaspirillum seropedicae*



\* Os resultados representam a média de três repetições.

A concentração de  $\mu\text{g AIA}/\mu\text{g proteína}$  e a absorbância foram determinadas de acordo com os métodos descritos em 3.7 e 3.8 respectivamente do Material e Métodos.

#### 4.4. ANALISES POR CROMATOGRAFIA

A partir do extrato da linhagem M2 (*Herbaspirillum seropedicae*), realizou-se uma série de métodos de purificação com a finalidade de isolar e concentrar o AIA.

O extrato resultante dessa purificação e a solução padrão de AIA foram submetidos à análise por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando o sistema de solvente (propanol:H<sub>2</sub>O:amônia aquosa, 7:2.3:0.7, v/v), e revelação como reagente S2 a 120°C.

Os resultados da CCD mostraram três bandas positivas (Salkowski S2) com distintos valores de  $R_f$ : **(1)** 3,8; **(2)** 3,5 e **(3)** 2,9, sendo  $R_f$  3,1 para a solução padrão (Figura 11).

A partir desta técnica, tentou-se purificar o material encontrado, realizando CCD em maior escala, deixando os pontos de aplicação do extrato bem concentrados.

A coloração que a banda 2 apresentou foi aparentemente igual à coloração rosa que a banda da solução padrão 1 mg/mL de ácido indol acético apresentou. Os valores de  $R_f$  dessas bandas foram próximos, sugerindo que a banda 2 pode ser do AIA ou de derivado dessa substância.

As bandas 1 e 3 também foram detectadas com o reagente S2, sugerindo a possibilidade de ser derivados do AIA, uma vez que o reagente de Salkowski é capaz de detectar outros compostos como o IPyA e IAM além do AIA, segundo dados obtidos por GLICKMAN & DESSAUX (1995).

FIGURA 11. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO TOTAL DA LINHAGEM M2 *Herbaspirillum seropedicae*



(AIA) solução padrão de 1 mg/mL de ácido indol acético e extrato total da linhagem M2 (*Herbaspirillum seropedicae*) (ETS) obtido após cromatografia em octyl-sepharose. CCD utilizando o sistema de solvente propanol:H<sub>2</sub>O:amônia aquosa, 7:2.3:0.7, v/v, sendo reveladas com reagente de Salkowski (S2) a 120°C.

## 5.CONCLUSÕES

1. O melhor resultado na identificação do AIA e derivados foi obtido com uma concentração de 7.9mol/L do Reagente de Salkowski.
2. Todas as linhagens do gênero *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Ochrobactrum* e *Rhizobium* e algumas linhagens de *Burkholderia* foram capazes de produzir AIA a partir do triptofano como precursor.
3. Os resultados obtidos sugerem que as linhagens tenham utilizado o AIA como fonte de carbono ou nitrogênio, resultando cinética de crescimento.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; OELLER, P.W.; THEOLOGIS, A. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 91: 326-330, 1994.

AGUILAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.134, p.2741-2746, 1988.

ANDERSON, G. R.. Nitrogen fixation by pseudomonas-like soil bacteria. **Journal Bacteriology** v.70, p.129-133, 1955.

APP, A.A.; WATANABE, I.; VENTURA, T.S.; BRAVO M.; JUREY, C.D. The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. **Soil Science**, Baltimore, v.141, p.448-452, 1986.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOL, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996a.

BALDANI, J. I., POT, B., KIRCHHOF, G., FALSÉN, E., BALDANI, V. L. D., OLIVARES, F. L., HOSTE, B., KERSTERS, K., HARTMANN, A., GILLIS, M., DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46: 802-810, 1996b.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum*: spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.57-60, 1987.

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.35-45, 1986a.

BALDANI JI, BALDANI VLD, SELDIN L, DOBEREINER J. Characterization of *Herbaspirillum-seropedicae* gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 36: 86-93, 1986b.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DOBEREINER, J. **Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.30, n.11, p.1335-1345, 1995.

BARTEL, B.; LECLERE, S.; MAGIDIN, M.; ZOLMAN, B.K.. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation** 20: 198-216. . 2001.



BARTEL, B.; FINK, G.R. Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 91: 6649-6653, 1994.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellin A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24:7-11, 1998.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.195-209, 1995.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using <sup>15</sup>N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**. Dordrecht, v.90, p.265-292, 1986.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924-929, 1983.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-264, 1976.

BURG, S.P.; BURG, E.A. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 55: 262-269, 1966.

CAMPELO, A. B. MSc Thesis, **UFRRJ**, 1976.

CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y.; GAO, J.L. *Rhizobium bainanensis*, a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In: International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia, Wuhan, China, p.16, 1994.

COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHENBERG, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interaction of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.106, p.341-346, 1993.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Crit. Rev. Microbiology**. v.21, p.1-18, 1995.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Mol. Gen. Genet.** v.243, p.463 - 472, 1994.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied Environmental Microbiology**, 54:2833-2837, 1988.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S rDNA characterization of new nitrogen-fixing bacteria from Banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**. v 67, p.2375-2379, 2001.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. Okon, Y., ed. *Azospirillum / plant associations*. Boca Raton: CRC Press, p.57-75, 1994.

DEMASON, D. A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, v. 32, p. 1432-2048, 2005.

DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by  $^{15}\text{N}_2$  incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, p.119-123, 1977.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI, 60p, 1995a.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous corps. In: FENDRIK, I. et. al., ed. *Azospirillum VI and related Microorganisms*. Berlin: Springer-Verlag, p.3-14, 1995b.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interaction: endophytic  $\text{N}_2$  fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v.44, p.310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers, 154p, 1987.

DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative  $\text{N}_2$  - fixing organisms. Graham, P.H.; Harris, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.469-483, 1982.

DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. **Nitrogen fixation**. London: Academic Press, p.301-334, 1980.

DÖBEREINER, J., DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. Newton, W.E.; Nyman, C.J., ed. **Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation**. Pulmann: Washington State University Press, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, Jena, v.124, p.224-230, 1970.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nv., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p.357-365, 1966.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959a.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* na solo. II Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959b.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Physiology Plant**, Rockville, v.105, p.1139-1147, 1994.

EKLÖF, S.; ÅSTOT, C.; SITBON, F.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium* *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. **Plant Journal** 23: 279-284, 2000.

EPSTEIN, E.; LUDWIG-MUURER, J. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. **Physiology Plant** v.88, p.382-389, 1993.

EPSTEIN, E.; LAVEE, S. Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid in cuttings of grapevine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europaea*). **Plant Cell Physiology** v.25, p.697-703, 1984.

FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate-reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.47-53, 1987.

FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 121-155, 1992.

FREITAS, J.L.M.; PEREIRA, P.A.A.; DÖBEREINER, J. Effect of organic matter and *Azospirillum* spp. strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., ed. **Associative N<sub>2</sub> fixation**. Boca Raton: CRC Press, v.1, p.155-163, 1981.

FU, X.; HARBERD, N.P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. **Nature** 421:440-443, 2003.

GARCIA DE SALAMONE, I.E. **Influencia de bacterias del genero *Azospirillum* sobre el rendimiento y nutricion nitrogenada del cultivo de maiz (*Zea mays* L)**. Buenos Aires., Universidade de Buenos Aires. 172p 1993.

GHAL, S. K.; THOMAS, G. V. Occurrence of *Azospirillum* spp. in coconut-based farming systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 114, p. 235-241, 1989.

GILLIS, M.; KERTERS, B.; HOSTE, D.J.; KROOPPENSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobaeter diazotrophicus* sp. nv. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.39, p.361-364, 1989.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.793-796, 1995.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**. Lancaster, v.26 p. 192-195, 1951.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Canadian Journal Microbiology** , v.49(12), p.781-7, 2003.

HARTMANN, A.; ASSMUS, B.; CHATZIMOTAS, A.; SCHLOTTER, M.; LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G. Use of molecular probes to study *Azospirillum*-plant interactions. In: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants. Saratov, Russia, p.59-63, 1995.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.29, p.916-923, 1983.

HILL, N.M.; PATRIQUIN, D.G. Maximizing N<sub>2</sub> fixation in sugarcane litter. p.59-60. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M.; UMALI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v.35, p.210-213, 1978. HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.339-364. 1994.

JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45. p.757-766, 1994.

KAMEN, M.D. Discoveries in nitrogen fixation. **Science**. v.188, p.38-42, 1953.

KAMEN, M.D., and H. Gest.. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Science** v.109, p.560, 1949.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; WERNER, D. Chemotaxis and *nod* gene activity of

*Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1705-1710, 1991.

KAVIMANDAN, S.K.; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. **Current Sciences**, Middletown, v.47, p.96-98, 1978.

KENNEDY, C. Entrevista concedida a Leonardo Magalhães Cruz e Guilherme Lanzi Sassaki. Curitiba, 16 fev., 2004.

KENNEDY, I. R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of assymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 41, p. 447-457, 2001.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sr. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.

KÖGL, F.; SMIT, A.J.. Über die Chemie des Wuchsstoffs. *K. Akad. Wetenschap. Amsterdam Proceedings. Section Science* 34: 1411-1416, 1931.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. v.6(12), p.1244-51, 2004.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *S. meliloti* comb nov., *S. saheli* sp. nov., *S. teranga* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44, 715-733, 1994.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation** 32: 219-230, 2000.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROZA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.37, p. 549-553, 1991.

MADHAIRAN, M.; SARAVANAN, V.S.; JOVI, D.B.; LEE, H.; THENMOZHI, R.; HARI, K.; SA, T. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiology Res**, v.159(3), p.233-43. 2004.

MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro, v.39, p. 587-596, 1979.

MALONEK S, BCMKE C, BORNBERG-BAUER E, ROJAS MC, HEDDEN P, HOPKINS P, TUDZYNSKI B. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Phytochemistry**. 66(11):1296-1311. 2005.

MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CHUBATSU, L.S; SOUZA, E.M.; KLEINA, M.; REGO, F.G. M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F.O. Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. **Journal Bacteriology**. 182(14): 4113–4116. 2000.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGÓVIA, L; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.

MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALLES, R. & CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant Soil**, 106:91-95, 1988.

MAYER, A.M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v.162 p.1670-1671, 1958.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; RIBEIRO JR., W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Use of *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains indigenous from Brazilian "Cerrado" region. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics; - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.162-163, 1996.

MINAMISAWA, K; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMIT, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58. p. 2832-2839, 1992.

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.657-663, 1990.

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total protein. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993.

MORGAN, P.W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. **Physiologia Plantarum** 15: 420–427, 1962.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biology and Chemistry** 381: 679–686, 2000a.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 211: 855–863, 2000b.

NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V. IAA synthesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Current science**, v.38, p. 517-518, 1969.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria : an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p.1-20, 1996.

NEVES, M.C.P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.22, p.1179-1192, 1985.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. **Proceeding**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 3-8, 2000.

NORDSTRÖM A, TARKOWSKI P, TARKOWSKA D, NORBAEK R, ÅSTOT C, DOLEZAL K, SANDBERG G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 101: 8039–8044. . 2004.

OKON, Y.; BURDMAN, S.; KIGEL, J.; ITZIGSOHN, R. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.55-56, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum-inoculated* roots. **Plant and Soil**. Dordrecht v.90, p.3-16, 1986.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends In Biotechnology**, Amsterdam, v.3. p.223-228, 1985.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB: p.65-66, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

OMAY, S. H.; SCHMIDT, W. A.; MARTIN, P.; BANGERTH, F. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense*. Cd. Under *in vitro* conditions. **Canadian Journal Microbiology**. V.39, p. 187-192, 1993.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol Lett.** v.233(1), p.15-21, 2004.

POUPART, J.; WADDELL, C.S. The *rib1* mutant is resistant to indole-3-butyric acid, an endogenous auxin in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 124: 1739-1751, 2000.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHELS, K.; VANDERLEYDEN, J. and H. AUONCKELEN. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.6, p.609-615, 1993.

RADWAN, T.; EL-SAYED EL-DESOK. **Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp.** Cairo, Cairo University, 201p 1999.

RAMOS, H.J.O.; RONCATO-MACCARI L.D. B.; SOUZA, E.M.; SOARES-RAMOS, J.R.L., HUNGRIA, M.; PEDROSA, F.O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology.** 97: 243-252, 2002.

RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P.P.; PASSOS, R.V.M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SCOTTI, M.R.; SÁ, N.M.H. Variability of isolated colonies in bean nodulating *rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. **Braz. J. Microbiol.** vol.33, 2002.

RAO, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 863-866, 1983.

REINHOLD, B.; HUREK, T. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.), and description of two species *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.43, p.574-584, 1993.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.

REIS, J.R.; F.B.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. **Infection of colonization of *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane plantlets.** In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB., p.225-226, 1995.

ROCHA, R.E.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plant with C<sub>4</sub> photosynthetic pathway. **Associative N<sub>2</sub> fixation**. Boca Raton. P67-69, 1981.



ROPER, M.M.; LADHA, J.K. Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174. p.211-224, 1995.

ROSATO, A.S.; WOLTERS, A.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Quantitative analysis of *Paenibacillus azotofixans* in soil and rhizosphere of wheat using MPN-PCR. In: International Symposium on Sustainable Agriculture of the Tropics - The Role Of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.228-229, 1995.

ROSS, J.J.; O'NEILL, D.P.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.J; ELLIOTT, R.C. Evidence that auxin promotes gibberellin A<sub>1</sub> biosynthesis in pea. **Plant Journal** 21: 547-552, 2000.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.

SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a Fast-Growing Species that Effectively Nodulates Soybeans. **Intern. Journal of Systematic Bacteriology**, v.34 484 – 486, 1984.

SCHWAB, S. Entrevista concedida a Leonardo Magalhães Cruz e Guilherme Lanzi Sassaki. Curitiba, 13 jan., 2005.

SEGÓVIA, L.; YOUNG, J.P.W., MARTÍNEZ-ROMERO, E.. Reclasification of Americans *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaesoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374, 1993.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.451-456, 1984.

SILVA, A.S.; PESSOA, M. C.P.Y.; FERRACINI, V.L.; CHAIM, A.; SILVA, C.M.M. de S.; HERMES, L.C. Produção integrada de frutas – o que é? **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, p. 5-14, 2001.

SILVERSTONE, A.L.; JUNG, H.S.; DILL, A.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; SUN, T.P. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 13: 1555-1565. 2001.

SITBON, F.; PERROT-RECHENMAMM, C. Expression of auxin-regulated genes. **Physiology Plant** v.100, p.443-455, 1997.

SKOOG, F.; MOLEIRO, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology** 11: 118-131. 1957.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. Handbook for Rhizobia – methods in legume-Rhizobium technology, p.336-337, 1994.

SOTO-URZUA, L.; XOCHINUA-CORONA, Y.G.; FLORES-ENCARNACION, M.; BACA, B.E. Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferases from *Azospirillum brasiliense* UAP 14 strain. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.294-298, 1996.

SOUZA, M. L. de. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 21, p. 28-31, 2001.

SPRENT, J.; FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRICK, K.L. ed. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.3-11, 1989.

STEENHOUT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Rev.** V.24(4), p.487-506, 2000.

SUTTLE, J.C. Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of *N*-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. **Plant Physiology** 88: 795-799. 1988.

TANG, Y.W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. **Arch. Biochem.** 13: 11-25, 1947.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.8, p.967-980, 1978.

THIMANN, K.V. **Hormone action in the whole life of plants**. Amherst: University of Massachusetts Press. 1977.

TIEN, T.M.; GASKIN, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

TRAN VAN, V.; GILLIS, M. Isolation from the rice rhizosphere of a new nitrogen fixing *Proteobacteria*, belonging to the genus *Burkholderia*. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., ed. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: American University in Cairo Press, p.299-309, 1994.

TRINICK, M.J.; HADOBAS, T.A. The biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.37, p.177-185, 1988.

WATANABE, I.; BARRAQUITO, W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living  $N_2$ -fixing organisms from rice roots. **Nature**, London, v.277, p. 565-566, 1979.

WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.L.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 201-205, 2001.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEBER, O.B. **Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa* spp.) e abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L) Merrill) e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas.** 1998. 192 p. Tese (Doutorado) -UFRRJ, Seropédica, RJ, 1998.

WOLBANG, C.M.; CHANDLER, P.M.; SMITH, J.J.; ROSS, J.J. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. **Plant Physiology** 134: 769-776. . 2004

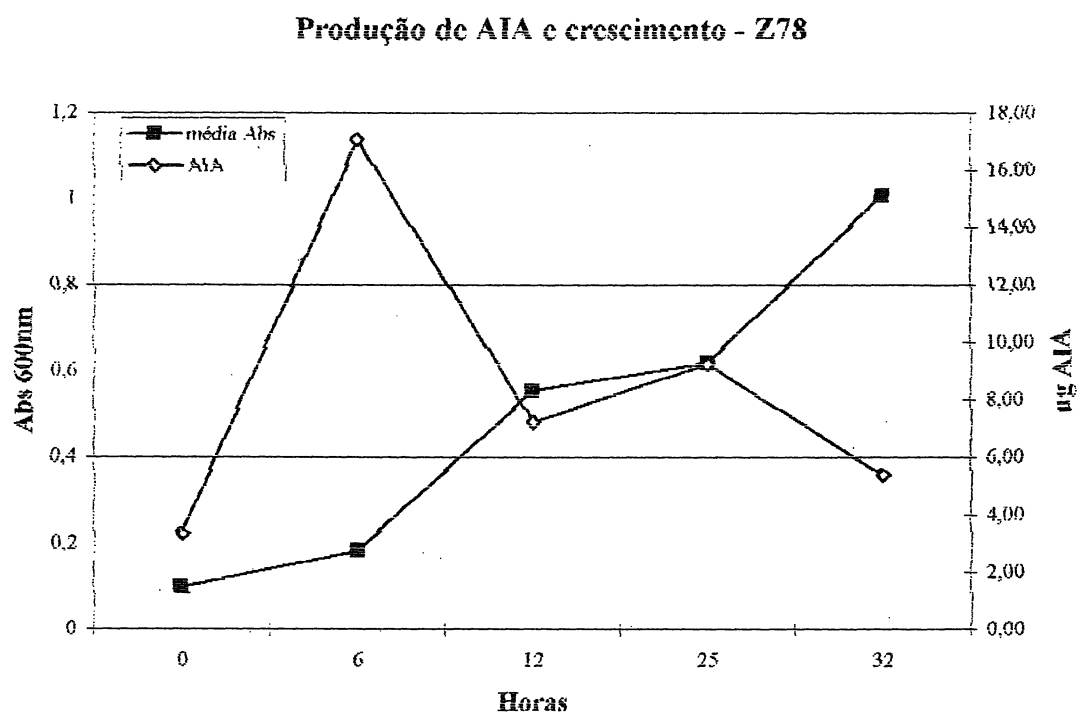
YABBUCHI, E.; KOSAKO, Y. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) com. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

YOUNG, J.P.W. Taxonomy of rhizobia. In: DIVERSITY AND TAXONOMY OF RHIZOBIA, **Proceeding**. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press., p. 3-10, 1996.

ZIMMER, W.; BOTHE, H. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**. V.110, p 239-247, 1988.

## 7.ANEXO

FIGURA 12. PRODUÇÃO DE AIA E CRESCIMENTO DA LINHAGEM Z78 (*Herbaspirillum seropedicae*) EM DEEP-WELL BLOCK.



FONTE: SCHWAB, S. Comunicação pessoal (dados não publicados).

Linhagem Z78 (*Herbaspirillum seropedicae*) crescida em placa de 96 poços (deep-well block) contendo meio NFB malato suplementado com solução de triptofano concentração final 5 g/L de D/L-Triptofano (2.5 g/L de D/L-Trp).